



Nouvelle méthode d'exploration fonctionnelle du nerf auditif

Charlène Batrel

► To cite this version:

Charlène Batrel. Nouvelle méthode d'exploration fonctionnelle du nerf auditif. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier I, 2014. Français. NNT : 2014MON13520 . tel-01197159

HAL Id: tel-01197159

<https://theses.hal.science/tel-01197159>

Submitted on 11 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par l'Université Montpellier I

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques et Biologiques pour la santé

Et de l'unité de recherche INSERM U1051
Institut des Neurosciences de Montpellier

Spécialité : **Neurosciences**

Présentée par **Charlène BATREL**

Nouvelle méthode d'exploration fonctionnelle du nerf auditif

Soutenue le 19 Décembre 2014 devant le jury composé de

M. Paul AVAN, Professeur, Université d'Auvergne
M. Paul DELTENRE, Professeur, ULB Bruxelles
M. Tobias MOSER, Professeur, UMG Göttingen
M. Alain UZIEL, Professeur, Université Montpellier I
M. Jean-Luc PUEL, Professeur, Montpellier I
M. Jérôme BOURIEN, MCU, Montpellier I

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Co-directeur de Thèse
Co-directeur de Thèse



RESUME

Contexte : La réponse synchrone des fibres du nerf auditif, évaluée à partir de l'onde I des potentiels d'action évoqués auditifs (PEA), ou à partir du potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif, est déterminante pour le dépistage des neuropathies cochléaires. De récentes études ont toutefois montré que le seuil et l'amplitude de cette réponse pouvaient être absolument normaux malgré une perte importante (désafférentation) de fibres du nerf auditif. Dans ce travail de thèse, nous proposons une nouvelle méthode d'exploration fonctionnelle, potentiellement applicable à l'homme, rendant mieux compte de l'intégrité des fibres auditives.

Matériel et méthodes : Chez des gerbilles, une perte sélective de fibres du nerf auditif a été induite par application d'une faible concentration d'ouabaïne dans la niche de la fenêtre ronde de la cochlée. Cette neuropathie a été caractérisée par des comptages de synapses (immunohistochimie/imagerie confocale 3D) et l'enregistrement de l'activité unitaire de fibres du nerf auditif. La réponse synchrone (PAC) et la réponse soutenue du nerf auditif ont été enregistrées 6 jours après l'application d'ouabaïne, à l'aide d'une électrode de recueil disposée dans la niche de la fenêtre ronde de la cochlée.

Résultats : L'application d'ouabaïne induit une perte spécifique des fibres à basse activité spontanée ($AS < 0,5$ potentiel d'action/sec) comme observé au cours du vieillissement et après une surexposition sonore. La disparition de cette population de fibres est indétectable à l'aide du PAC car leur réponse unitaire est à la fois retardée et désynchronisée. L'amplitude de la réponse soutenue du nerf se révèle être un bien meilleur indicateur de la perte des fibres à basse activité spontanée. Pour aller plus loin, nous avons exploré une méthode permettant d'étudier le décours temporel de l'activité des fibres auditives. Cette approche rend compte des mécanismes de fusion vésiculaire (libération rapide et soutenue) de la première synapse auditive.

Conclusion : L'analyse de la réponse soutenue du nerf auditif facilite le dépistage et la caractérisation des pertes de fibres auditives. D'autre part, l'analyse de la réponse temporelle de ces fibres permet d'étudier la neurotransmission de la première synapse auditive. Appliquée à l'homme, cette méthode devrait améliorer le dépistage des neuropathies cochléaires, avec une meilleure différenciation des atteintes d'origine synaptique et/ou neuronale.

Mots clés : cochlée, nerf auditif, potentiel d'action composite, activité soutenue du nerf auditif, enregistrements unitaires, ouabaïne, neuropathie.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **Jean-Luc Puel** et **Jérôme Bourien** pour tout ce qu'ils m'ont apporté durant ces années. Je fais partie des nombreux étudiants dont vous avez influencé la vie et l'avenir. Merci d'avoir pris le temps de nous transmettre votre passion, un véritable élément moteur qui enrichi notre quotidien. À titre plus personnel, je vous remercie de m'avoir offert des opportunités inespérées, de m'avoir guidée, encouragée et soutenue tout au long de cette thèse.

Je remercie les Professeurs **Paul Avan** et **Paul Deltenre**, ayant accepté d'être rapporteurs de cette thèse. C'est un véritable honneur de bénéficier de votre expertise pour discuter de ce travail. J'adresse également mes remerciements aux Professeurs **Alain Uziel** et **Tobias Moser**, ayant accepté de participer au jury de cette thèse.

Je tiens bien évidemment à remercier l'entreprise **Cochlear** pour le contrat CIFRE ayant permis la réalisation de cette thèse. Merci à **Kristien Verhoeven**, **Claudiu Treaba** et **Sandrine Cabrol** pour l'intérêt porté à ce travail, pour la richesse de nos échanges et pour votre soutien infaillible.

Merci à tous les membres de l'équipe du Professeur Puel pour leur amitié et leur soutien. Une petite famille qui va beaucoup me manquer ! Avec une pensée particulière pour **Antoine Huet** et **Gilles Desmadryl** qui m'ont beaucoup appris et aidée dans le cadre des enregistrements unitaires. Un grand MERCI à **Marie Guillet**, **Gaston Sendin**, **Florian Hasselman** et **Régis Nouvian**, pour leur soutien dans les périodes plus difficiles. Votre amitié représente beaucoup pour moi. Je remercie également **Florence François**, **Marc Lenoir**, **Sabine Ladrech**, **Michel Eybalin**, **Emilie Brun**, **Guy Rebillard** et **Jing Wang** pour leurs précieux conseils concernant les expériences d'immunohistochimie et d'électrophysiologie. C'est un vrai plaisir de travailler à vos côtés !

J'en profite également pour remercier l'équipe de l'animalerie, les membres de l'équipe administrative, et les responsables des plateaux techniques (histologie, imagerie, informatique, laverie et magasin) qui m'ont toujours accueillie et aidée avec beaucoup de gentillesse. Un grand MERCI à **Véronique Brugioti**, **Marissa Teigell** et **Agnès Barthoux** pour leur soutien et leur amitié.

J'aimerais également remercier les membres de l'équipe implant du CHU Guy de Chauliac. Une grande famille que je n'oublierai jamais. Les deux années passées à travailler avec vous ont été les deux plus belles années de ma vie. Merci à **Jean-Pierre Piron** et **Françoise Villemus**, pour m'avoir formée au réglage d'implant, et merci à toutes les copines orthophonistes avec qui j'ai eu la chance de travailler : **Nadjmah Lenel**, **Géraldine Geffriaud**, **Anick Bastin**, **Julie Labouesse**, **Delphine Espitalier**... Merci pour tous les moments de complicité passés à vos côtés !

Pour finir, je remercie ma famille et mes proches pour leur affection. Je vous demande pardon pour mes absences. Plus que quelques années de séparation et tout cela sera derrière nous. La prochaine aventure sera l'occasion de nous retrouver dans des lieux inédits...

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCTION | 6 |
| 2. CODAGE DE L'INFORMATION SONORE | 8 |
| 2.1. Le système auditif périphérique..... | 8 |
| 2.1.1. L'oreille externe..... | 8 |
| 2.1.2. L'oreille moyenne | 9 |
| 2.1.3. L'oreille interne | 10 |
| 2.2. Organe sensori-nerveux de la cochlée | 12 |
| 2.2.1. Les fluides cochléaires | 12 |
| 2.2.1.1. Gradient électrochimique du potassium..... | 12 |
| 2.2.1.2. Importance de l'homéostasie potassique | 14 |
| 2.2.2. Les cellules sensorielles | 14 |
| 2.2.2.1. Rôle actif des cellules ciliées externes | 16 |
| 2.2.2.2. Transfert de l'information par les cellules ciliées internes | 19 |
| 2.2.2.3. Potentiels de récepteur des cellules ciliées | 20 |
| 2.2.3. Les synapses à ruban des cellules ciliées..... | 21 |
| 2.2.3.1. Organisation des synapses à ruban | 22 |
| 2.2.3.2. Exocytose rapide et soutenue dans le temps..... | 23 |
| 2.2.3.3. Hétérogénéité des synapses | 25 |
| 2.3. Neurones cochléaires | 26 |
| 2.3.1. Innervation de l'organe de Corti | 26 |
| 2.3.1.1. Innervation des cellules ciliées externes | 26 |
| 2.3.1.2. Innervation des cellules ciliées internes..... | 29 |
| 2.3.2. Neurones auditifs primaires | 30 |
| 2.3.2.1. Morphologie | 30 |
| 2.3.2.2. Enregistrements unitaires | 31 |
| 2.3.2.3. Réponses des fibres en fonction de la fréquence | 33 |
| 2.3.2.4. Réponses des fibres en fonction du temps | 34 |
| 2.3.2.5. Réponses des fibres en fonction de l'intensité | 37 |
| 2.3.3. Potentiels électriques globaux | 39 |
| 2.3.3.1. Potentiel d'action composite | 39 |
| 2.3.3.2. Potentiels évoqués auditifs précoces (PEAP) | 40 |
| 2.3.3.3. Potentiels stationnaires (ASSR) | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 3. MATERIEL ET METHODES | 42 |
| 3.1. Préparation des drogues | 42 |
| 3.2. Implantation des électrodes et application des drogues | 42 |
| 3.3. Exploration fonctionnelle | 44 |
| 3.3.1. Produits de distorsion acoustiques | 44 |
| 3.3.2. Potentiels cochléaires..... | 44 |
| 3.3.2.1. Potentiel d'action composite du nerf auditif (PAC)..... | 45 |
| 3.3.2.2. Activité soutenue du nerf auditif | 45 |
| 3.3.2.3. Peri-stimulus time response (PSTR) | 46 |
| 3.3.3. Activité unitaire des fibres auditives | 46 |
| 3.3.3.1. Chirurgie et placement de l'électrode de recueil | 47 |
| 3.3.3.2. Caractérisation des fibres du nerf auditif..... | 47 |
| 3.3.3.3. Enregistrements simultanés..... | 47 |
| 3.4. Investigation morphologique | 49 |
| 3.4.1. Immunohistochimie | 49 |
| 3.4.2. Imagerie confocale | 49 |
| 3.4.3. Reconstruction 3D | 50 |
| 3.5. Analyse des données | 51 |
| 3.5.1. Modèle d'ajustement des PSTH et PSTR | 51 |
| 3.5.2. Analyse statistique | 52 |
| 4. RESULTATS..... | 53 |
| 4.1. Modèle expérimental de neuropathie | 54 |
| 4.1.1. Nombre de synapses à ruban par cellule ciliée interne | 54 |
| 4.1.2. Propriétés fonctionnelles des fibres auditives | 57 |
| 4.2. Activité synchrone des fibres du nerf auditif | 61 |
| 4.2.1. Réponse synchrone dans le modèle de neuropathie | 61 |
| 4.2.2. Contribution unitaire à la réponse synchrone | 63 |
| 4.3. Activité soutenue des fibres du nerf auditif..... | 73 |
| 4.3.1. Contribution unitaire à l'activité soutenue | 73 |
| 4.3.2. Réponse soutenue du nerf auditif..... | 75 |
| 4.3.3. Comparaison entre réponses synchrones et soutenues | 85 |
| 4.4. Codage temporel des fibres du nerf auditif | 87 |
| 4.4.1. Protocole d'étude du codage temporel des fibres auditives | 87 |
| 4.4.2. Enregistrements simultanés PSTH/PSTR | 88 |

| | |
|---|-----|
| 4.4.3. Effet du niveau de stimulation | 89 |
| 4.4.4. Effet de la fréquence centrale de stimulation..... | 97 |
| 4.4.5. Comparaisons inter-espèces | 100 |
| 5. DISCUSSION | 102 |
| 5.1. Action de l'ouabaïne sur les fibres du nerf auditif | 103 |
| 5.2. Ouabaïne et fibres à basse activité spontanée | 103 |
| 5.3. Pertinence physiologique du modèle « ouabaïne »..... | 104 |
| 5.4. Contribution des fibres du nerf auditif au seuil audiométrique | 105 |
| 5.5. Contribution des fibres à l'amplitude du PAC | 105 |
| 5.6. Fonction écologique des fibres à basse activité spontanée | 107 |
| 5.7. Activité spontanée du nerf auditif et origine du dôme à 900 Hz | 109 |
| 5.8. Activité soutenue des fibres du nerf auditif | 111 |
| 5.9. Peri-stimulus time response (PSTR) | 112 |
| 5.10. Conclusion et perspectives..... | 114 |
| 6. REFERENCES | 116 |

1. INTRODUCTION

La cochlée est l'organe périphérique de l'audition ayant pour fonction de transformer le signal sonore en un message nerveux interprétable par le système nerveux central. Quatre rangées de cellules ciliées sont disposées tout au long de la cochlée. Parmi ces cellules ciliées, on distingue : 1) les cellules ciliées externes (CCE, 3 rangées) qui augmentent l'amplitude et la sélectivité fréquentielle de la stimulation mécanique ; et 2) les cellules ciliées internes (CCI, 1 rangée) qui assurent le transfert de la stimulation aux fibres du nerf auditif. Chaque CCI est innervée par un grand nombre de fibres afférentes présentant différentes propriétés fonctionnelles. Tandis que certaines fibres sont activées dès les bas niveaux de stimulation (codage des seuils auditifs), d'autres fibres sont spécialisées dans le codage des niveaux supraliminaires.

Une perte sélective de CCE entraîne inévitablement une perte d'amplification mécanique et donc une élévation des seuils auditifs (Liberman and Dodds, 1984, Davis et al., 1989) observable en clinique à l'aide d'une simple audiométrie tonale. En revanche, si ce sont les fibres afférentes qui disparaissent sélectivement, les seuils auditifs peuvent rester quasi normaux malgré une perte de fibres (désafférentation) pouvant atteindre 50% (Kujawa and Liberman, 2009, Bourien et al., 2014). Ce scénario pathologique, de type neuropathie (Starr et al., 1991, Starr et al., 1996), est donc beaucoup plus difficile à détecter en clinique et requiert une batterie importante de tests auditifs supraliminaires (Zeng et al., 2005).

Pendant des années la communauté scientifique a considéré que dans la très grande majorité des surdités cochléaires acquises, les CCE étaient les premières à être affectées, entraînant une dégénérescence secondaire des fibres afférentes. Une série d'articles récents montre que ce schéma pathologique est probablement trop simpliste. Au cours du vieillissement par exemple, il a été montré chez la souris que le nombre de CCE commence à diminuer à demi-vie (~80 semaines chez la souris) alors que la perte de fibres afférentes commence très tôt, et progresse tout au long de la vie (0,25% par semaine chez la souris), pour atteindre ~35% de perte en fin de vie (Kujawa and Liberman, 2006, Sergeyenko et al., 2013). Chez l'homme, l'observation post-mortem de cochlées montre un mécanisme similaire, à savoir une perte progressive des fibres (100 fibres/an) tout au long de la vie avec une bonne préservation des cellules ciliées (Makary et al., 2011). Ces données suggèrent qu'il existe un stade précoce du vieillissement cochléaire où les CCE sont intactes, alors que

les fibres du nerf auditif ont commencé à dégénérer. En outre, il a été montré qu'une surexposition sonore aiguë, caractérisée par une élévation temporaire des seuils auditifs (Kujawa and Liberman, 2009, Lin et al., 2011, Furman et al., 2013), peut entraîner la désafférentation de 50% des fibres ciblées par le traumatisme, tandis que les CCE restent intactes. L'effet cumulé du vieillissement et de surexpositions sonores répétées pourrait donc conduire à un profil audiométrique caractérisé par des seuils auditifs quasi-normaux, associés à des troubles importants de l'audition supraliminaire.

Le but de cette thèse était de développer une méthode d'exploration fonctionnelle rendant mieux compte de l'intégrité du complexe CCI - fibres afférentes. Il répond à une demande clinique de plus en plus pressante pour le diagnostic des neuropathies auditives (Starr et al., 1996, Zeng et al., 2005) dont le nombre est très certainement sous-estimé à l'heure actuelle. Pour ce faire nous avons mis au point, chez la gerbille, un modèle expérimental de neuropathie avec perte sélective d'un faible pourcentage de fibres afférentes (jusqu'à 25% de perte). Nous avons ensuite utilisé ce modèle pour développer et évaluer une méthode de dépistage des neuropathies potentiellement applicable à l'homme.

2. CODAGE DE L'INFORMATION SONORE

2.1. Le système auditif périphérique

Nous entendons un son lorsque des vibrations de l'air ambiant, atteignant notre tympan, le mettent en mouvement dans des conditions d'amplitude et de fréquence telles que cette stimulation mécanique induit une sensation auditive. L'amplitude des vibrations acoustiques est mesurée en décibel, avec un niveau de pression acoustique de référence de 20 μPa lorsque cette amplitude est exprimée en dB Sound Pressure Level (dB SPL). La fréquence représente le nombre de vibrations acoustiques par seconde. Elle est mesurée en Hertz (Hz) et définit la hauteur des sons: plus la fréquence de la vibration est faible, plus le son est grave, et inversement, plus la fréquence de vibration est élevée, plus le son est aigu. Les mammifères disposent d'une audition dont la gamme fréquentielle couvre environ 10 octaves et dont la dynamique en intensité est d'environ 100 dB dans la zone de meilleure sensibilité. Pour collecter et transformer ces sons, l'oreille des mammifères est constituée de trois parties (**Figure 2.1**): l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne, ayant chacune des rôles bien définis.

2.1.1. L'oreille externe

L'oreille externe est constituée du pavillon et du conduit auditif externe. Elle est limitée par une membrane souple, le tympan, qui la sépare de l'oreille moyenne (**Figure 2.1**). L'oreille externe se comporte comme une antenne acoustique: le pavillon, associé au volume crânien, diffracte les ondes sonores et les canalise vers le conduit auditif externe. Cet ensemble assure une protection mécanique du tympan et joue un rôle de résonateur qui modifie sélectivement l'amplitude et la phase des ondes acoustiques. Ces modifications, qui sont particulières à chaque fréquence et à chaque angle d'incidence des ondes sonores, caractérisent la fonction de transfert de l'oreille externe. Chez l'homme, pour l'azimut 45° dans le plan horizontal, le gain acoustique induit à 3 kHz est de l'ordre de 20 dB. Contrairement à certains animaux, l'homme doit tourner toute la tête pour orienter ses pavillons. Leur implantation et leur relief participent cependant à des mécanismes monauraux de localisation des sources sonores. Légèrement dirigés vers l'avant, ils permettent de distinguer les sons issus d'une source située droit devant de ceux issus d'une source située droit derrière.

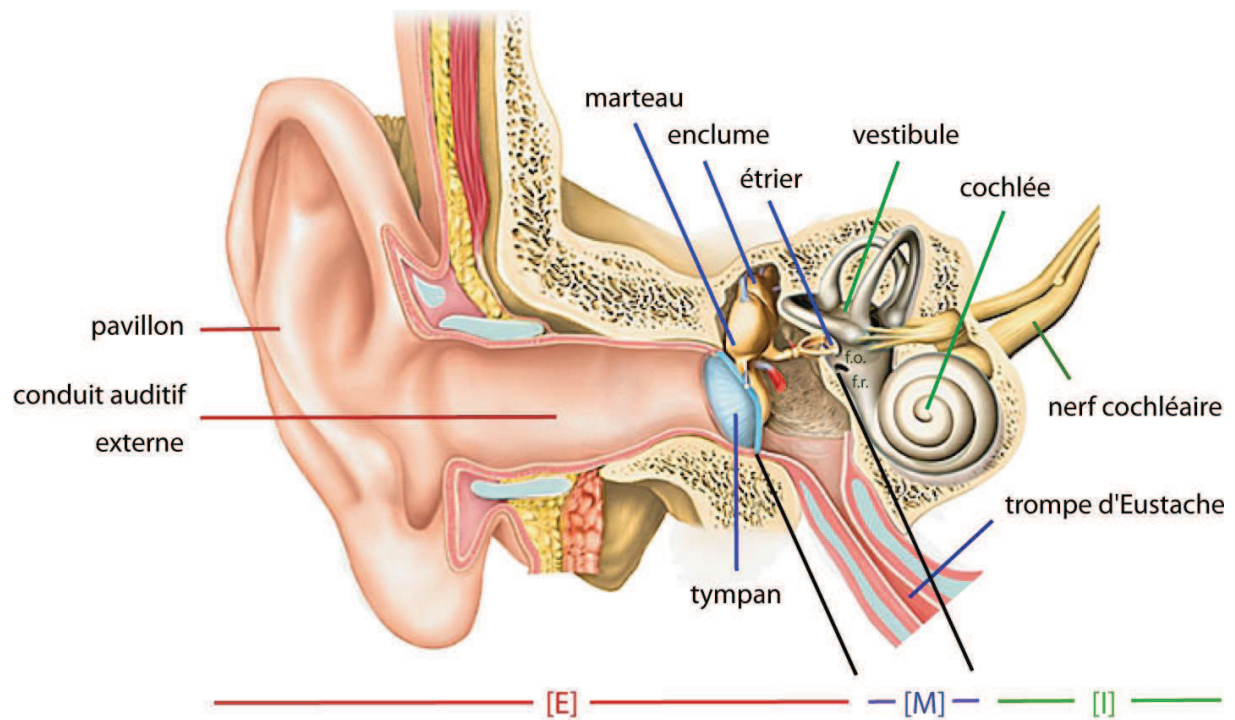


Figure 2.1: L'organe périphérique de l'audition. Le système auditif périphérique permet la transformation des vibrations sonores en un système bioélectrique interprétable par le système nerveux central. Ce système est constitué de trois compartiments: l'oreille externe (E), l'oreille moyenne (M) et l'oreille interne (I). L'oreille externe est constituée du *pavillon* et du *conduit auditif externe*. Elle est limitée par une membrane souple, le *tympan*, qui la sépare de l'oreille moyenne. L'oreille moyenne comprend une chaîne de trois osselets: le *marteau*, l'*enclume* et l'*étrier*. Elle communique avec le milieu extérieur via la *trompe d'Eustache* qui assure l'équilibre de pression de part et d'autre du tympan. L'oreille interne est constituée du *vestibule*, organe de l'équilibre, et de la *cochlée*, organe de l'audition. La cochlée est enroulée dans une paroi osseuse, avec deux ouvertures vers l'oreille moyenne: la fenêtré ovale (*f.o.*) et la fenêtré ronde (*f.r.*). Ces fenêtrés sont fermées par une membrane, avec un contact permanent de la plaque de l'étrier sur la membrane de la fenêtré ovale. Dessin Michel Saemann - Archives Larousse.

2.1.2. L'oreille moyenne

L'oreille moyenne est une cavité aérienne située entre l'oreille externe et l'oreille interne (**Figure 2.1**). Cette caisse tympanique est fermée sur l'oreille externe par la membrane du tympan, et sur l'oreille interne par l'intermédiaire des fenêtrés ronde et ovale. Elle communique avec le milieu extérieur via la trompe d'Eustache qui assure l'équilibre de pression de part et d'autre du tympan. L'oreille moyenne joue un double rôle de transmission et de protection. Lorsque le tympan vibre sous l'action des variations de pression transportées par l'onde sonore, il met en mouvement trois os (le marteau, l'enclume et l'étrier). Cette chaîne ossiculaire se comporte comme un levier qui transforme les oscillations du tympan en

un mouvement de piston de la plaque de l'étrier dans la fenêtre ovale. Le rapport des surfaces tympan/fenêtre ovale ($>20/1$) permet une amplification qui assure le transfert des pressions acoustiques entre le milieu aérien et le milieu liquidien de l'oreille interne. L'oreille moyenne est donc un adaptateur d'impédance sans lequel une très grande partie de l'énergie acoustique serait perdue.

L'oreille externe joue également un rôle protecteur contre les sur-stimulations acoustiques. Les deux muscles de la chaîne tympano-ossiculaire (le muscle tenseur du tympan, situé sur le marteau, et le muscle de l'étrier) se contractent par voie réflexe lorsque l'oreille est soumise à un niveau sonore supérieur à 70 dB. En augmentant la rigidité du système, cette contraction réduit essentiellement la transmission des sons de fréquence inférieure à 1000-2000 Hz, avec une atténuation du niveau sonore d'environ 10 dB. Toutefois, le changement d'impédance mécanique produit par la contraction des muscles débute avec une latence de 20 à 40 ms et n'atteint son maximum qu'après 90 à 100 ms. De plus, le muscle de l'étrier se relâche par fatigue après quelques minutes. Ainsi ce réflexe, dit stapédien, est inefficace contre les bruits impulsionnels et les bruits de longue durée.

2.1.3. L'oreille interne

L'oreille interne renferme les organes de l'équilibre (le vestibule) et de l'audition (la cochlée). L'organe de l'audition assure la conversion du signal provenant de l'oreille moyenne en un signal électrique qui est ensuite véhiculé par le nerf auditif jusqu'au cortex.

La cochlée est recouverte d'une paroi osseuse présentant deux ouvertures vers l'oreille moyenne: la fenêtre ovale et la fenêtre ronde (**Figure 2.1**). La fenêtre ovale est fermée par une membrane en contact permanent avec la plaque de l'étrier. Elle transmet donc les vibrations mécaniques des osselets aux liquides de l'oreille interne. La fenêtre ronde joue le rôle de membrane d'expansion pour le liquide de l'oreille interne: son élasticité absorbe les variations de volume induites par les mouvements de la fenêtre ovale.

Lorsque les liquides de l'oreille interne sont mis en mouvement par les vibrations de l'étrier, il se forme une onde propagée qui débute de la fenêtre ovale et croît le long de la membrane basilaire jusqu'à atteindre un maximum d'amplitude à une distance donnée. Le positionnement de ce point de résonance le long de la cochlée dépend de la fréquence de la vibration. Les basses fréquences de stimulation font entrer en résonance l'apex de la

cochlée, où la membrane basilaire est plus large et plus fine, tandis que les hautes fréquences de stimulation font entrer en résonnance la base de la cochlée, où la membrane basilaire est plus étroite et plus épaisse. Cette théorie de l'onde propagée (Von Békésy, 1956) ne permet pas à elle seule d'expliquer la sélectivité en fréquence de la cochlée. Nous aborderons par la suite les mécanismes actifs améliorant la sélectivité fréquentielle de la membrane basilaire (2.2.2.1.).

Situé sur la membrane basilaire, l'organe de Corti (**Figure 2.2**), organe sensori-nerveux de la cochlée, est également affecté par ces déformations qui entraînent l'ouverture mécanique de canaux cationiques au niveau des cellules sensorielles. L'entrée d'ions potassique dans les cellules sensorielles engendre leur dépolarisation et permet la transduction de l'énergie vibratoire en énergie électrique.

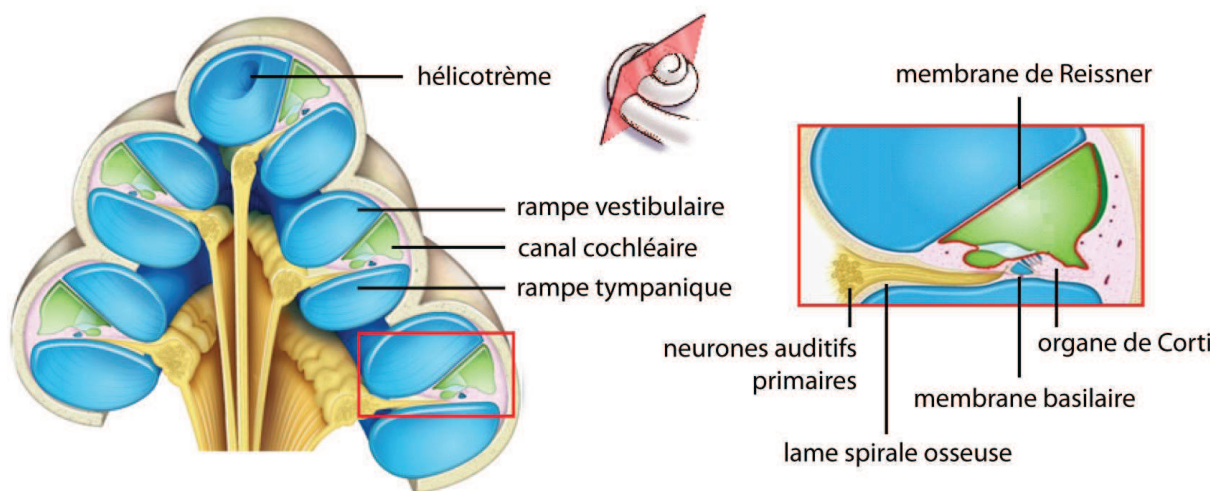


Figure 2.2: Coupe transversale de la cochlée. La cochlée est formée de deux rampes et d'un canal, enroulés en spirale autour d'un axe osseux, le modiolus. La *rampe vestibulaire* et la *rampe tympanique*, remplies de périlymphe (*bleu*), communiquent entre elles par un petit orifice situé à l'apex de la cochlée, nommé *héliotrème*. La rampe vestibulaire part de la fenêtre ovale jusqu'à l'apex de la cochlée, où débute la rampe tympanique jusqu'à la fenêtre ronde. Ces rampes sont disposées de part et d'autre du *canal cochléaire*. Ce dernier est rempli d'endolymphe (*vert*), un liquide particulièrement riche en potassium. Le canal cochléaire est séparé de la rampe vestibulaire par la *membrane de Reissner*, et de la rampe tympanique par la *membrane basilaire*. C'est sur cette membrane qu'est situé l'*organe de Corti*, organe sensori-nerveux de la cochlée, siège des cellules ciliées. Cet épithélium sensoriel est innervé par les *neurones auditifs primaires*. Dessin Stéphan Blatrix - site «Voyage au centre de l'audition».

2.2. Organe sensori-nerveux de la cochlée

L'organe de Corti doit son nom à l'anatomiste Alfonso Corti, qui en fit la description détaillée en 1851. Organe sensori-nerveux de la cochlée, il est composé des cellules sensorielles (ou cellules ciliées), des fibres nerveuses qui leur sont connectées, et des structures annexes ou de support (**Figure 2.3**). Les compositions ioniques des divers compartiments cochléaires jouent un rôle important dans le bon fonctionnement de l'organe de Corti.

2.2.1. Les fluides cochléaires

La périlymphe et l'endolymphe diffèrent profondément par leur composition ionique. Alors que la périlymphe, riche en sodium et pauvre en potassium, a une composition voisine des autres liquides extra cellulaires, comme le liquide céphalo-rachidien (Na^+ et Cl^- proches de l'équilibre électrostatique), l'endolymphe, pauvre en sodium, se caractérise par une surcharge en potassium. Cependant, au lieu d'un potentiel de diffusion du K^+ , négatif, on mesure, dans l'endolymphe, un potentiel endolymphatique de +80 mV. Ce potentiel endocochléaire est la somme de deux potentiels : 1) un potentiel positif (120 mV), dû à une sécrétion active de K^+ par la strie vasculaire, épithélium tapissant la paroi latérale osseuse du canal cochléaire (**Figure 2.3**) ; et 2) un potentiel négatif (- 40 mV) dû à la diffusion passive des ions K^+ dans les cellules ciliées. L'activité des cellules sensorielles dépend de la concentration en potassium de l'endolymphe (Sewell, 1984, Rickheit et al., 2008).

2.2.1.1. Gradient électrochimique du potassium

Il semble que la cochlée ait trouvé le moyen de faire entrer et sortir le potassium des cellules sensorielles sans dépense d'énergie. En règle générale, si un ion entre dans une cellule de manière passive, il sortira de manière active et vice versa.

Cependant, au niveau de l'organe de Corti, seul le pôle apical des cellules ciliées baigne dans l'endolymphe très riche en potassium (150 mM). Lorsque l'organe de Corti est mis en mouvement, le déplacement des cils des cellules sensorielles ouvre les canaux cationiques sensibles à l'étirement. Avec un potentiel endocochléaire situé aux environs de +80 mV chez l'homme, et un potentiel de membrane des cellules ciliées situé entre -70 mV

et -55 mV, l'ouverture mécanique des canaux cationiques entraîne une entrée passive et massive des ions potassiques (en surcharge dans l'endolymphe) dans les cellules ciliées. On comprend alors qu'une faible concentration en potassium de l'endolymphe aurait pour effet de limiter la dépolarisation, et donc l'activité des cellules sensorielles.

La sortie de ces ions potassiques se fait également de manière passive puisque leur concentration est plus grande à l'intérieur de la cellule ciliée (150 mM) qu'à l'extérieur de son corps cellulaire qui baigne dans la périlymphe (5 mM).

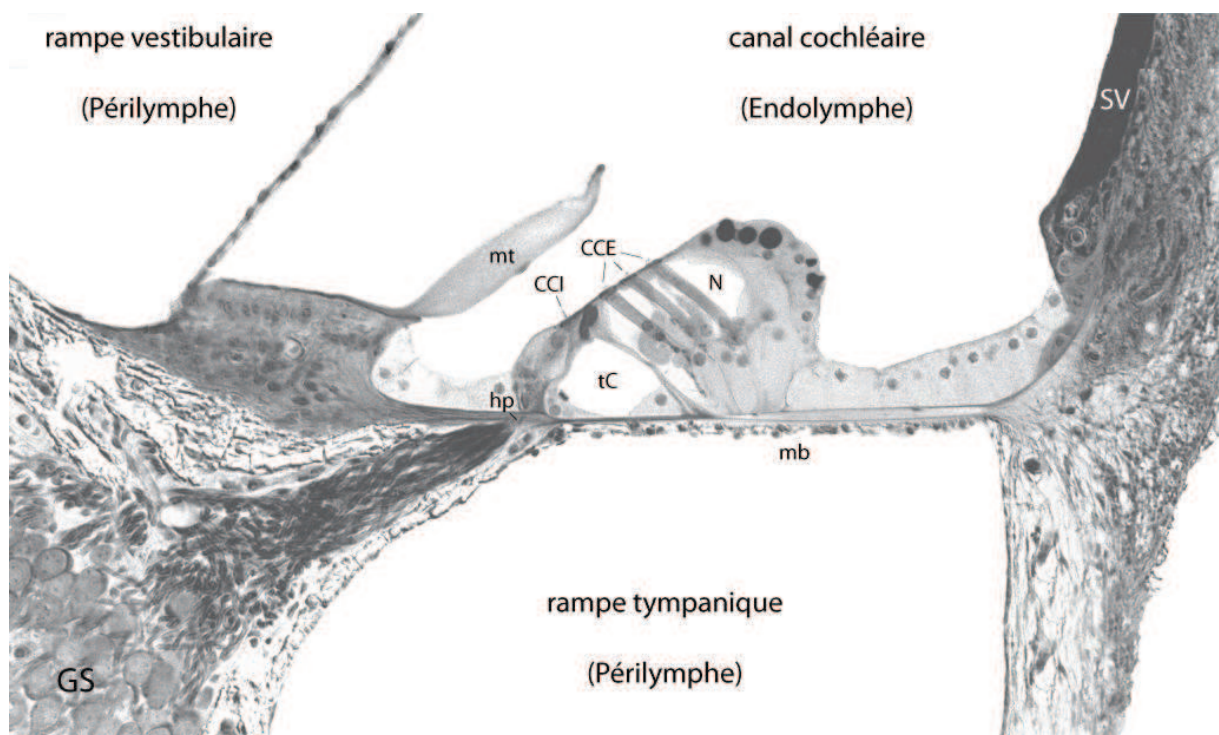


Figure 2.3: Section transversale d'un tour de spire de la cochlée. Coupe transversale effectuée au troisième tour d'une cochlée de cobaye visualisée en microscopie électronique à balayage. Cette image montre l'organe de Corti, situé entre la membrane basilaire (*mb*), la membrane de Reissner (*mR*) et la strie vasculaire (*SV*). Dans l'organe de Corti, se trouvent les cellules sensorielles, avec une rangée de cellules ciliées internes (*CCI*) et trois rangées de cellules ciliées externes (*CCE*), représentées de part et d'autre du tunnel de Corti (*tC*). La membrane tectoriale (*mt*), flottant dans l'endolymphe, coiffe les stéréocils des cellules ciliées. La *CCI* est entourée de cellules de soutien, alors que les *CCE*, ancrées sur leurs cellules de soutien, ont leurs membranes latérales en contact direct avec la corticolympe (peu différente de la périlymphe) qui remplit le tunnel de Corti (*tC*) et les espaces de Nuel (*N*). La partie apicale des cellules ciliées et celle des autres cellules annexes forment la lame réticulaire qui isole le compartiment endolymphatique. Les fibres nerveuses gagnent ou quittent l'organe de Corti par l'habenula perforata (*hp*) au travers de la membrane basilaire. Les corps cellulaires des neurones auditifs primaires sont situés dans le ganglion spiral (*GS*). Image Marc Lenoir.

2.2.1.2. Importance de l'homéostasie potassique

La strie vasculaire force les ions K^+ à passer du plasma sanguin dans l'endolymphe et les ions Na^+ à passer de l'endolymphe dans le plasma, et ce en dépit de gradients de concentration défavorables. Différents acteurs sont impliqués dans ce transport actif. Leur rôle est important car la réduction du potentiel endocochléaire et/ou de la concentration potassique de l'endolymphe altère le fonctionnement des cellules ciliées (Sewell, 1984, Rickheit et al., 2008). À terme, l'affaissement de la membrane de Reissner entraîne la dégénérescence des cellules ciliées.

Par exemple, chez la souris, l'inactivation des gènes *KCNQ1/KCNE1* codant pour le canal potassique KCNQ1 et sa sous-unité régulatrice KCNE1, entraîne une surdité associée à une absence de sécrétion de potassium dans l'endolymphe (Vetter et al., 1996, Lee et al., 2000, Letts et al., 2000, Casimiro et al., 2001). De même, l'inactivation du gène *SLC12A2* codant pour le co-transporteur $Na^+-K^+-2Cl^-$ entraîne une surdité associée à une diminution de la sécrétion de potassium dans l'endolymphe (Delpire et al., 1999, Dixon et al., 1999, Flagella et al., 1999). L'importance de l'homéostasie potassique dans la cochlée est également mise en évidence par les études bloquant les pompes Na^+ , K^+ -ATPase par diffusion de ouabaïne dans les liquides cochléaires (Kuijpers et al., 1967, Konishi and Mendelsohn, 1970, Konishi and Salt, 1980, Marcus et al., 1981).

2.2.2. Les cellules sensorielles

La transduction des informations mécaniques en signaux électrochimiques est assurée par les cellules sensorielles. Ces dernières sont nommées cellules ciliées car leur pôle apical (plaque cuticulaire), en contact avec l'endolymphe, porte une centaine de stéréocils disposés en 3 ou 4 rangées de tailles croissantes (**Figure 2.4**). L'ensemble des stéréocils se comporte comme une unité fonctionnelle et se déplace donc de façon homogène (Kozlov et al., 2007). Ils sont reliés entre eux par de nombreux liens transversaux et par des liens terminaux (tip-links). Lorsque les vibrations d'une onde sonore sont communiquées aux liquides de l'oreille interne, le mouvement de la membrane basilaire crée une force de cisaillement qui déplace la membrane tectoriale en travers des stéréocils des cellules ciliées.

Au cours de leurs étirements périodiques, les liens apicaux qui relient les cils ouvrent des canaux cationiques mécano-sensibles : le potassium (K^+) entre et la cellule est dépolarisée. Dans un même temps, un autre cation, le calcium (Ca^{2+}) entre lui aussi.

Il existe deux types de cellules ciliées disposés de part et d'autre du tunnel de Corti. Les cellules ciliées externes (CCE), situées sur le bord externe de la spirale cochléaire, sont organisées en trois rangées (**Figure 2.3**). Dotées de propriétés contractiles, ces cellules augmentent l'amplitude et la sélectivité fréquentielle de la stimulation. Les cellules ciliées internes (CCI), situées sur le bord interne de l'organe de Corti, sont organisées sur une seule rangée (**Figure 2.3**). Elles sont responsables de la transduction mécano-électrique de l'information sonore.

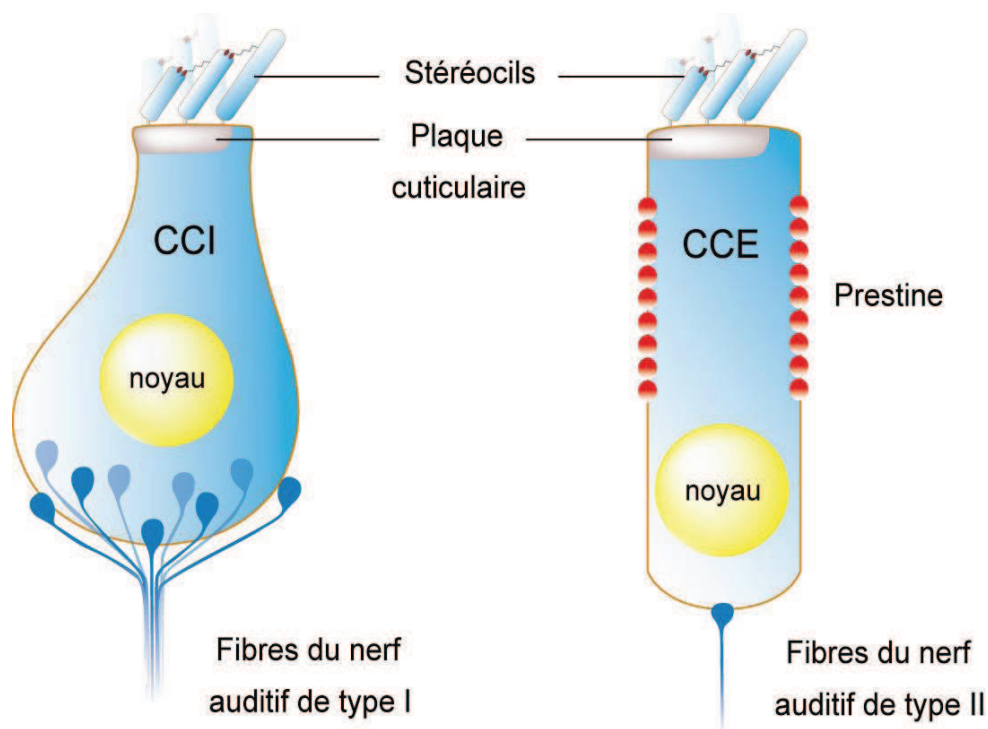


Figure 2.4: Représentation schématique des cellules ciliées. Gauche : Cellule ciliée interne (CCI). Droite : Cellule ciliée externe (CCE). Les cellules ciliées sont dotées d'un faisceau de *stéréocils* qui détectent les ondes sonores. Les stéréocils sont ancrés dans la *plaque cuticulaire*, une structure riche en actine, et sont reliés entre eux par des filaments appelés *tip-link*. L'extrémité de ces derniers est connectée à un canal sensible à l'étirement. En réponse à une stimulation sonore, le canal mécano-transducteur s'ouvre et permet l'influx de cations, principalement du potassium et du calcium en raison de la composition de l'endolymphe. L'entrée de cations dépolarise alors les CCI et CCE. L'activité électro-motile de la CCE est assurée par la protéine *prestine*, située le long de sa membrane latérale. Tandis que 95% des fibres du nerf auditif sont connectées avec les CCI (fibres afférentes de type I), seul 5% des fibres projettent sur les CCE (fibres afférentes de type II) (Spoendlin, 1969, 1972).

2.2.2.1. Rôle actif des cellules ciliées externes

D'un point de vue morphologique, les CCE ont une forme parfaitement cylindrique et leur longueur croît régulièrement de la base à l'apex de la cochlée. Le noyau des CCE est situé à la base des cellules (**Figure 2.4**), juste au-dessus du compartiment synaptique qui renferme de nombreuses mitochondries. Au pôle apical, les stéréocils des CCE sont disposés en W sur leur plaque cuticulaire, et la rangée la plus haute des stéréocils est liée à une structure amorphe recouvrant l'organe de Corti : la membrane tectoriale. Ce couplage est particulièrement ferme à la base de la cochlée où la rangée la plus haute des stéréocils est ancrée dans la membrane tectoriale. Les CCE reposent par leur base sur des cellules de soutien, les cellules de Deiters, et sont séparées latéralement entre elles par les espaces de Nuel (**Figure 2.3**). Leurs membranes latérales sont donc libres d'échange avec la périlymphe, et leur structure, unique dans l'organisme, permet aux CCE de se contracter.

Electromotilité des CCE :

C'est sur des CCE dissociées que l'électromotilité a été découverte en montrant que les CCE se raccourcissent en réponse à une dépolarisation et à l'inverse s'allongent en réponse à une hyperpolarisation (Brownell et al., 1985). Ces changements de taille peuvent atteindre jusqu'à 4% de la longueur des CCE et peuvent suivre des fréquences de stimulation compatibles avec les fréquences audibles. La persistance de l'électromotilité après digestion des réseaux cytosquelettiques sous membranaire, par dialyse intracellulaire de trypsine, montre que les éléments moteurs responsables de l'électromotilité résident dans la membrane plasmique elle-même (Huang and Santos-Sacchi, 1994). Le clonage de la protéine prestine, par l'équipe du Pr. P. Dallos, a permis de découvrir la nature du moteur moléculaire à l'origine de l'électromotilité (Zheng et al., 2000). On considère aujourd'hui que la dépolarisation de la CCE (entrée de K^+ au moment de la stimulation sonore) modifie la conformation de cette protéine transmembranaire.

À l'inverse des canaux ioniques sensibles au potentiel, la détection du potentiel transmembranaire est étroitement associée aux ions Cl^- intracellulaires (Oliver et al., 2001). Le déplacement de ces anions de leurs sites de liaison à la prestine vers l'intérieur du cytoplasme serait responsable du raccourcissement de la protéine, et donc du raccourcissement de la CCE. À l'inverse, lorsque la CCE se repolarise, les anions se lient à

la prestine, entraînant un allongement de la CCE. Ainsi, les CCE se contractent en phase avec les déplacements de la membrane basilaire, et augmentent les déplacements des structures qui entraînent l'excitation des CCI.

L'amplificateur cochléaire :

Quand les CCE sont soumises à un courant alternatif allant jusqu'à 70 kHz, leurs parois se contractent et se décontractent bien cycle par cycle. Ainsi, l'électromotilité peut opérer à des fréquences très élevées et pourrait expliquer l'existence de l'amplificateur cochléaire pour l'ensemble des fréquences audibles. Associé à cette électromotilité, un phénomène d'inhibition latérale pourrait également participer à la sélectivité en fréquence. En effet, la contraction d'une CCE en réponse à un saut de potentiel dépolarisant entraîne l'hyperpolarisation de la CCE voisine (Zhao and Santos-Sacchi, 1999). L'inactivation du gène *Pres* entraîne une perte d'audition de 50 dB (Liberman et al., 2002), soit le gain octroyé par les mécanismes actifs, et une perte de la sélectivité en fréquence (Cheatham et al., 2004).

Pourtant, une interrogation demeure car la dépolarisation de la touffe ciliaire (site de la transduction) doit se propager aux parois latérales de la CCE. Or la constante de temps de la membrane plasmique des CCE, produit de sa résistance et de sa capacité membranaire, fait que cette membrane se comporte comme un filtre "passe-bas", c'est-à-dire qu'elle ne laisse passer sans déformation que des fréquences électriques inférieures à 1 kHz. Il y a là un véritable paradoxe, puisque l'électromotilité apparaît durant l'évolution chez les mammifères, quand l'organe auditif devient sensible aux sons de haute fréquence. Or, elle ne pourrait agir qu'à basse fréquence à cause de la contrainte imposée par la constante de temps de la membrane. Plusieurs hypothèses ont été proposées afin de concilier les propriétés de la membrane plasmique et l'électromotilité des CCE, comme des potentiels extracellulaires pouvant gouverner la dépendance au voltage de la prestine (Oesterle and Dallos, 1986), ou un potentiel de membrane aux environs de -40 mV pour les CCE, permettant une réduction de la constante de temps membranaire (Johnson et al., 2011).

Au cours des années, une hypothèse alternative a été proposée, plaçant l'amplificateur dans la touffe ciliaire. Cette hypothèse repose sur l'observation de mouvements spontanés et de mouvements actifs de la touffe ciliaire (Crawford and Fettiplace, 1985, Howard and Hudspeth, 1987, Denk and Webb, 1992, Benser et al., 1996, Martin and Hudspeth, 1999).

En réponse à une stimulation mécanique, la déflexion initiale des stéréocils s'accompagne par un déplacement supplémentaire des stéréocils dans la direction du stimulus (Kennedy et al., 2005). A l'inverse de la membrane plasmique des CCE, le déplacement des stéréocils ne se comporte pas comme un filtre passe-bas et peut donc suivre chaque cycle de stimulation sonore de plusieurs dizaines de kHz. La force exercée par les stéréocils pourrait donc être à la base des mécanismes actifs (voir (Fettiplace and Hackney, 2006) pour revue).

Quoi qu'il en soit, les CCE sont indispensables à la fonction d'amplification cochléaire (Dallos and Harris, 1978). Cette amplification justifie : 1) la grande sensibilité de l'oreille interne : le gain obtenu par le mécanisme d'amplification est de 100 à 1000 en pression, c'est-à-dire de 40 à 60 dB, 2) la non-linéarité de l'amplification cochléaire, avec une efficacité des CCE qui baisse quand le niveau sonore augmente, et 3) la grande sélectivité fréquentielle de la cochlée : chaque cellule ciliée répondant préférentiellement à une fréquence donnée. Etant donné que les CCE assurent un meilleur couplage entre la membrane basilaire et la membrane tectoriale à la base de la cochlée (stéréocils ancrés dans la membrane tectoriale), les mécanismes actifs sont surtout efficaces pour les fréquences aiguës. Les fréquences graves sont donc moins bien discriminées. Une manifestation *in vivo* des mécanismes actifs est l'existence des oto-émissions acoustiques.

Les oto-émissions acoustiques :

Reflet de l'électromotilité des CCE, les oto-émissions acoustiques (OEA) sont des émissions sonores de la cochlée. Ces sons se propagent par voie rétrograde vers la fenêtre ovale, puis à travers l'oreille moyenne et le conduit auditif externe où on peut les enregistrer au moyen d'un microphone. Leur présence témoigne de l'intégrité des CCE. Si les CCE sont absentes ou lésées, une surdité allant jusqu'à 50 dB sera combinée à une mauvaise sélectivité en fréquence et à l'absence d'OEA.

Les OEA provoquées par une stimulation sonore peuvent être enregistrées à l'aide d'une sonde placée dans le conduit auditif externe. Intégrés à cette sonde, un haut-parleur envoie un son stimulant très bref et un microphone recueille les OEA émises par les CCE. Les OEA apparaissent sous forme d'une oscillation prolongée. Sur un sujet normo-entendant, leur seuil de détection est très bas (souvent inférieur au seuil de perception).

La recherche d'OEA provoquées constitue un test simple, non invasif, rapide, objectif et spécifique de l'intégrité des CCE. Ce test est devenu un classique de l'exploration fonctionnelle en ORL, notamment dans le cadre du dépistage d'un problème de surdité cochléaire chez le nouveau-né.

Les produits de distorsion acoustique :

Les produits de distorsion acoustique (PDA) forment une catégorie d'otoémissions provoquées. Cette catégorie requiert l'envoi simultané dans le conduit auditif externe de deux sons purs de fréquences f_1 et f_2 proches (conventionnellement, $f_2 > f_1$) et de niveaux L_1 et L_2 , soit égaux, soit légèrement asymétriques ($L_1 > L_2$). Les CCE sont la cible de l'investigation par PDA. Ces cellules ciliées amplifient les sons dont la fréquence est proche de leur fréquence de résonance, et comme leurs stéréocils ont un mouvement qui distord l'onde acoustique au voisinage de cette fréquence, le fait de recevoir deux fréquences f_1 et f_2 leur fait engendrer des PDA aux fréquences combinaisons entières de f_1 et f_2 . Le PDA correspondant à $2f_1 - f_2$ est le plus ample chez l'homme et à ce titre, le plus facile à mettre en évidence. Sa recherche est devenue un test clinique de la fonctionnalité des CCE dans la région codant pour f_2 .

2.2.2.2. Transfert de l'information par les cellules ciliées internes

Les CCI se distinguent des CCE par la forme en poire de leur corps cellulaire (**Figure 2.4**). Au nombre de 3500 par cochlée chez l'homme, les CCI sont situées sur le bord interne de l'organe de Corti et sont organisées sur une seule rangée. Contrairement aux CCE, les stéréocils sont disposés en ligne et ne sont pas ancrés dans la membrane tectoriale. Le noyau est en position médiane et la membrane plasmique latérale est classique. Bien que trois fois moins nombreuses que les CCE, les CCI sont les véritables cellules sensorielles. Elles assurent à la fois la transduction de la vibration mécanique en signal électrique et le transfert de l'information par la libération de neurotransmetteur vers les neurones auditifs primaires (Moser and Beutner, 2000, Glowatzki and Fuchs, 2002).

De la même façon que pour les CCE, chaque CCI répond préférentiellement à une fréquence donnée. Les stéréocils des CCI n'étant pas ancrés à la membrane tectoriale, leur déflexion est favorisée par le contact direct avec la bande de Hensen de la membrane

tectoriale. L'ouverture des canaux mécano-sensibles des stéréocils entraîne l'entrée de potassium dans la cellule. La dépolarisation de la CCI provoque l'ouverture de canaux calciques sensibles au potentiel, situés au voisinage des zones actives (Platzter et al., 2000, Brandt et al., 2003, Zenisek et al., 2003, Neef et al., 2009). L'influx de calcium entraîne la libération dans la fente synaptique du neurotransmetteur des CCI: le glutamate (Issa and Hudspeth, 1994, Parsons et al., 1994, Tucker and Fettiplace, 1995, Issa and Hudspeth, 1996, Moser and Beutner, 2000, Zenisek et al., 2003, Frank et al., 2009, Meyer et al., 2009).

2.2.2.3. Potentiels de récepteur des cellules ciliées

En fonction de la fréquence et de l'intensité de la stimulation acoustique, il y a modulation de la dépolarisation des cellules sensorielles et naissance d'un potentiel intracellulaire, aussi appelé potentiel de récepteur. Cette réponse électrique à une stimulation acoustique peut être enregistrée grâce à une électrode placée directement dans la cellule. Les premiers enregistrements effectués (Russell and Sellick, 1978) ont constitué une étape importante dans la compréhension de la physiologie de l'audition. Ces enregistrements ont notamment révélé l'étroite sélectivité fréquentielle des CCI (**Figure 2.5A**). Le potentiel de récepteur des cellules ciliées présente deux composantes : une composante alternative (AC) qui suit la fréquence de stimulation, et une composante continue (DC) qui reproduit l'enveloppe de la stimulation acoustique.

Les composantes alternatives et continues dépendent de la fréquence de stimulation et du type de cellule ciliée (CCE vs CCI). La composante alternative est plus importante dans les CCE que dans les CCI, tandis que la composante continue est prépondérante dans les CCI. D'autre part, l'amplitude de la composante continue croît avec la fréquence, tandis que la composante alternative est majoritaire pour les basses fréquences (Russell and Sellick, 1978). En effet, pour les fréquences de stimulation inférieures à 1 kHz, le potentiel de membrane se dépolarise en fonction du déplacement des stéréocils. À chaque déflexion des stéréocils (en phase avec l'onde sonore), la CCI se dépolarise et libère du glutamate. Au delà de 1 kHz, la constante de temps membranaire empêche la membrane plasmique de suivre en phase les cycles de la stimulation: la composante continue (DC) est alors prédominante et les CCI codent l'enveloppe de la stimulation sonore.

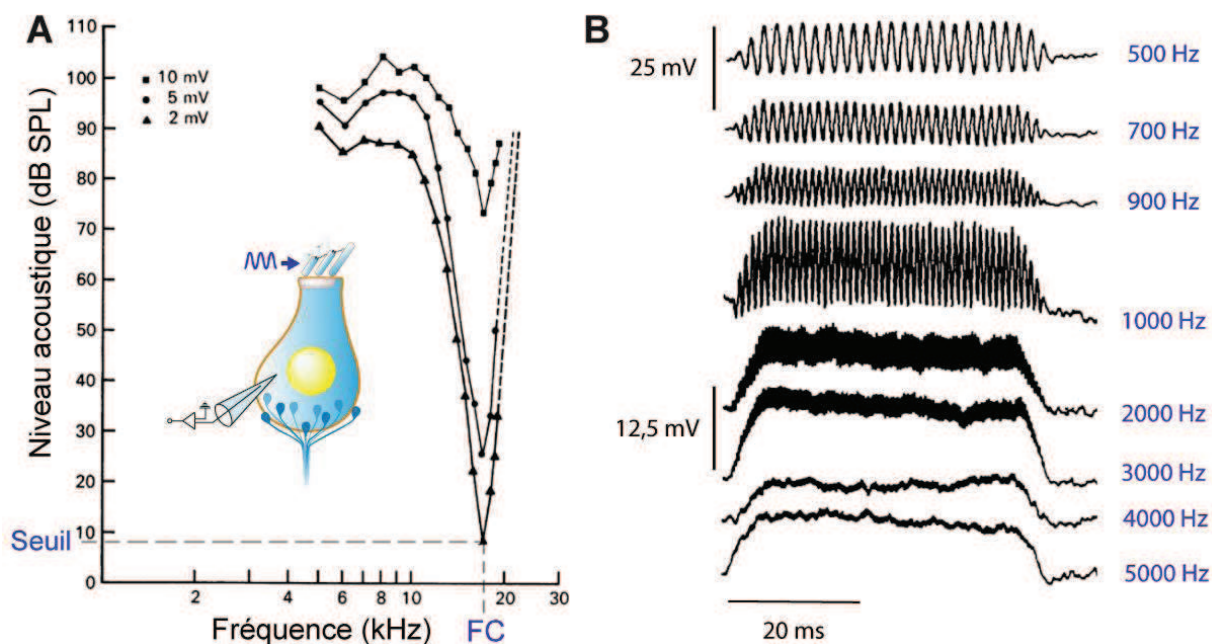


Figure 2.5 : Potentiels de récepteur d'une cellule ciliée interne. **A** : Sélectivité fréquentielle d'une cellule ciliée interne (enregistrements intracellulaires chez le cochon d'inde). Courbes iso-réponses intensité-fréquence représentant le niveau d'intensité nécessaire, en fonction de la fréquence de stimulation, pour obtenir un potentiel de récepteur (composante continue) de 2 mV, 5 mV, et 10 mV. La fréquence de meilleure sensibilité de cette CCI (fréquence caractéristique: FC) est 17 kHz, avec un seuil de réponse estimé à 8 dB SPL pour un potentiel de récepteur de 2 mV (Russell and Sellick, 1978). **B** : Potentiels de récepteur d'une CCI en réponse à des ondes sonores de différentes fréquences. Au-delà de 1 kHz, la composante alternative diminue tandis que la composante continue augmente (Russell and Sellick, 1983).

Les composantes alternatives (AC) et continues (DC) du potentiel de récepteur intracellulaire sont à la base des potentiels globaux sensoriels, que sont les potentiels microphoniques et de sommation.

2.2.3. Les synapses à ruban des cellules ciliées

Chaque zone active d'une CCI se caractérise par une structure dense aux électrons appelée ruban synaptique (**Figure 2.6**, (Nouvian et al., 2006)). Les rubans synaptiques sont ancrés à la membrane plasmique et entourés d'une centaine de vésicules, lesquelles contiennent du glutamate, le neurotransmetteur des CCI.

2.2.3.1. Organisation des synapses à ruban

Il y a un seul ruban par zone active et une dizaine à une vingtaine de zones actives par CCI. Chaque zone active est connectée par la terminaison d'un seul neurone auditif (Liberman, 1982). La topologie des synapses est intimement liée à la présence des rubans synaptiques.

La protéine Ribeye est l'unique protéine spécifique des rubans (environ 4000 molécules de Ribeye par ruban; (Zenisek et al., 2004)). Elle est essentielle à leur formation (Schmitz et al., 2000). La surexpression de Ribeye entraîne la formation de rubans ectopiques et son absence provoque une désorganisation des synapses afférentes, associée à une dégradation du transfert synaptique (Wan et al., 2005, Sheets et al., 2011). La protéine Bassoon ancre les rubans à la membrane plasmique. L'invalidation du gène qui code pour Basson entraîne une réduction de 80% des rubans ancrés à la membrane (Dick et al., 2003, Khimich et al., 2005, Buran et al., 2010, Frank et al., 2010). La perte des rubans à la membrane est associée à une réduction massive de l'exocytose et des courants calciques aux zones actives.

Les synapses à rubans sont concentrées au pôle baso-latéral des CCI avec une distance inter-synapse de 2 μm (Meyer et al., 2009). Parmi le nombre total de rubans contenus dans une cellule, 5% sont localisés dans le cytoplasme (rubans flottants cytoplasmique) et reflètent probablement le recyclage des rubans à la membrane. Cependant, les rubans synaptiques sont relativement immobiles sur plusieurs minutes (entre 0,35 et 13,5 nm/sec; (Zenisek et al., 2004)). L'analyse ultrastructurale des CCI montre 4 types de vésicules (**Figure 2.6**): 1) des vésicules cytoplasmiques dont le déplacement est aléatoire (Holt et al., 2004), 2) des vésicules liées aux rubans à une distance de 25 nm, 3) des vésicules arrimées à la membrane et liées aux rubans - environ 20 vésicules synaptiques par ruban - et 4) des vésicules arrimées uniquement à la membrane plasmique (Lenzi et al., 1999, Lenzi et al., 2002).

L'entrée de calcium provoque la fusion des vésicules à la membrane et la libération du glutamate dans la fente synaptique. Les canaux calciques de type L des CCI sont exclusivement formés de la sous-unité Cav1.3 en association avec la sous-unité auxiliaire $\beta 2$ (Platzer et al., 2000, Brandt et al., 2003, Sidi et al., 2004, Neef et al., 2009). Une mutation du gène codant pour la sous-unité Cav1.3 est responsable d'une surdité associée à une

bradycardie (Baig et al., 2011). La distribution des canaux calciques Cav1.3 à la membrane plasmique est assurée par la protéine Harmonine, dont la perte de fonction est à l'origine du syndrome de Usher 1C (perte de vision et surdité; (Gregory et al., 2011)). L'observation des canaux calciques en microscopie super-résolutive a montré que ces derniers étaient organisés chez les CCI adultes sous la forme de bande, en dessous du ruban synaptique (Frank et al., 2010, Wong et al., 2014).

Otoferline, à l'origine d'une surdité non-syndromique DFNB9 (Yasunaga et al., 1999), est fortement exprimée par les CCI. L'Otoferline se caractérise par 6 domaines C2 (domaines fixant le calcium) et serait le détecteur calcique de l'exocytose (Roux et al., 2006). Enfin, l'Otoferline, qui interagit avec les protéines Rab8 et Myosin VI (Heidrych et al., 2008, Roux et al., 2009), réapprovisionne les vésicules synaptiques aux zones actives (Pangrsic et al., 2010, Pangrsic et al., 2012).

Vglut3 est l'unique transporteur vésiculaire du glutamate des CCI (Obholzer et al., 2008, Ruel et al., 2008, Seal et al., 2008). Une mutation du gène *SLC17A8* codant Vglut3 est à l'origine d'une surdité non-syndromique DFNA25. La souris dont le gène *Slc17a8* a été invalidé présente une surdité sévère (qui provient de l'absence de glutamate intra-vésiculaire). À l'inverse, la surdité observée chez les patients DFNA25 est progressive. Ces résultats indiquent que la souris sans Vglut3 ne reproduit pas la surdité DFNA25 et appelle à l'étude de la souris porteuse de la mutation humaine A211V.

2.2.3.2. Exocytose rapide et soutenue dans le temps

L'entrée de calcium provoque la fusion des vésicules à la membrane et la libération du glutamate dans la fente synaptique. En l'absence de stimulation sonore, le mouvement brownien des stéréocils (Jaramillo and Wiesenfeld, 1998) maintient le potentiel de membrane des CCI à des valeurs correspondantes à l'activation des courants calciques (Johnson et al., 2011). La libération continue de glutamate qui en résulte est à l'origine de l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. En réponse à une stimulation sonore, la CCI se dépolarise, ce qui augmente la probabilité d'ouverture des canaux calciques. L'augmentation d'amplitude des entrées calciques aux zones actives se traduit par une augmentation de la fréquence des courants excitateurs post-synaptiques (Glowatzki and Fuchs, 2002).

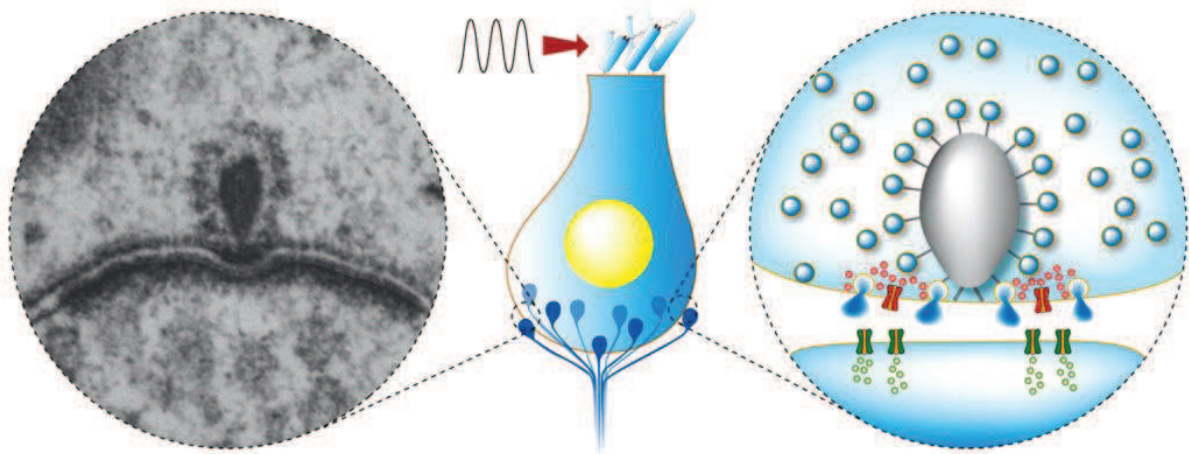


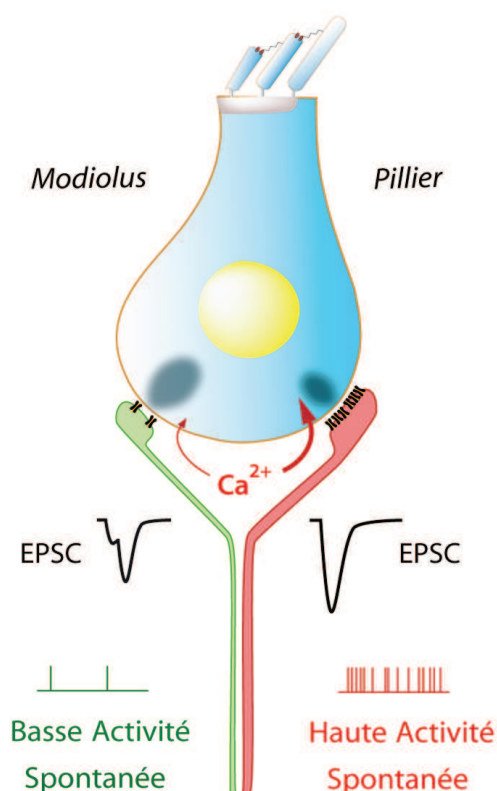
Figure 2.6 : Transduction des cellules ciliées internes. En réponse à une onde sonore, la dépolarisation de la cellule ciliée interne ouvre les canaux calciques (rouge), situés à proximité des zones actives. Ces dernières se caractérisent par un ruban synaptique (gris), ancré à la membrane plasmique et entouré d'un halo de vésicules synaptiques. L'élévation de calcium intracellulaire (points rouges) provoque l'exocytose des vésicules synaptiques et la libération du glutamate dans la fente synaptique. L'activation des récepteurs au glutamate (vert) est associée aux courants excitateurs post-synaptiques. Le message nerveux est véhiculé jusqu'au noyau cochléaire du tronc cérébral via les neurones auditifs primaires. (Gauche, observation en microscopie électronique à transmission)

Les synapses à ruban des cellules sensorielles auditives assurent une libération rapide du neurotransmetteur. Cette libération peut durer dans le temps et suivre cycle par cycle une stimulation de 2 kHz. L'utilisation de tampons calciques a permis de distinguer deux contingents de vésicules synaptiques associés à la libération du neurotransmetteur. Un premier contingent est associé à la fusion rapide ($\tau=9$ ms) d'un nombre limité de vésicules synaptiques (moins de 50 vésicules par synapse) probablement liées au ruban synaptique et arrimées à la membrane plasmique (*RRP*, pour *Readily Releasable Pool*). Le second contingent correspond à une fusion vésiculaire soutenue dans le temps avec 9000 vésicules/sec (*SRP*, pour *Slowly Releasable Pool*). Cette seconde composante pourrait refléter la fusion de vésicules éloignées des canaux calciques et/ou le réapprovisionnement des vésicules aux zones actives (Moser and Beutner, 2000, Johnson et al., 2005, Schnee et al., 2005, Rutherford and Roberts, 2006, Goutman and Glowatzki, 2007, Li et al., 2009). Suite à l'identification du contingent de vésicules dont la libération est rapide, il a été proposé que la déplétion de ces vésicules soit à l'origine de l'adaptation rapide des fibres du nerf auditif (Moser and Beutner, 2000).

2.2.3.3. Hétérogénéité des synapses

Il existe une forte hétérogénéité de l'amplitude des influx calciques entre les synapses d'une seule CCI. Cette hétérogénéité provient de la variation du nombre de canaux calciques aux différentes synapses d'une seule CCI (Frank et al., 2009). Il a été proposé que les variations d'amplitude des entrées calciques soient responsables des différents taux de décharge des fibres du nerf auditif (Frank et al., 2009, Meyer et al., 2009). Une synapse dont l'influx calcique est élevé entraînerait une fusion massive de vésicules et favoriserait la génération de potentiels d'action au sein la fibre afférente. À l'inverse, une entrée calcique de faible amplitude provoquerait une exocytose limitée et une activité réduite de la fibre afférente. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi les fibres innervant une même CCI (même potentiel de membrane) peuvent présenter différentes activités spontanées. Il est également cohérent avec les propriétés de codage des fibres auditives. En effet, les fibres à haute activité spontanée sont les plus sensibles aux bas niveaux de stimulation et leur activité est saturée à plus hauts niveaux. Les fibres à basse activité spontanée, moins sensibles, assurent le codage des plus hauts niveaux de stimulation. La mise en jeu de ces différentes fibres permettrait le codage de l'intensité sonore pour une dynamique de 100 dB. D'autres différences morphologiques sont associées à ces différentes fibres (**Figure 2.7**)

Figure 2.7 : Hétérogénéité des synapses à rubans et conséquences physiologiques. L'amplitude des influx calciques (flèches rouges) pourrait déterminer l'activité spontanée des fibres du nerf auditif. D'autre part, la forme et les cinétiques d'activation des courants excitateurs post-synaptiques (EPSC, en noir) seraient à l'origine des différents taux de décharge des fibres du nerf auditif. Les fibres à basse activité spontanée et à haut seuil se caractérisent par des densités post-synaptiques de surface réduite et un petit diamètre. Elles sont connectées à des rubans synaptiques de grande taille. À l'inverse, les fibres à haute activité spontanée et à bas seuil ont des densités post-synaptiques étendues, un gros diamètre et elles sont connectées à des rubans compacts de petite taille (Liberman et al., 2011). Cependant, l'hétérogénéité des influx calciques n'est pas distribuée selon un axe modiolus - pilier, à l'inverse de la forme des rubans, des surfaces des densités post-synaptiques et de l'activité des fibres du nerf auditif (Meyer et al., 2009).



Une hypothèse alternative implique la forme des courants excitateurs post-synaptiques (Grant et al., 2010). En effet, l'enregistrement en patch-clamp de l'activité d'un bouton afférent montre une forte variabilité de l'amplitude des courants excitateurs post-synaptiques avec des cinétiques d'activation et d'inactivation homogène (Glowatzki and Fuchs, 2002). Ces résultats s'expliquent par une libération coordonnée dans le temps de plusieurs vésicules synaptiques (libération multi-vésiculaire). Les courants post-synaptiques dont la forme est monophasique (activation rapide - 0,5 ms) seraient associés à des fibres à haute activité spontanée. Tandis que les courants multiphasiques (activation lente - 1 ms) seraient associés aux fibres à basse activité spontanée (Grant et al., 2010).

2.3. Neurones cochléaires

2.3.1. Innervation de l'organe de Corti

L'organe de Corti reçoit une double innervation, à la fois afférente et efférente (**Figure 2.8**). L'innervation afférente provient des neurones auditifs primaires, dont les corps cellulaires sont situés au niveau du ganglion spiral. Les neurones auditifs primaires sont des neurones bipolaires. Leur prolongement périphérique se termine dans l'organe de Corti, au contact des cellules ciliées, et leur prolongement central se termine dans les noyaux cochléaires du tronc cérébral. On distingue les neurones ganglionnaires de type I et les neurones ganglionnaires de type II, innervant respectivement les CCI et les CCE. L'innervation efférente provient de deux systèmes dont les corps cellulaires sont originaires de l'olive bulbaire. Le système efférent médian innerve directement les CCE, tandis que le système efférent latéral innerve les dendrites des fibres afférentes connectées aux CCI.

2.3.1.1. Innervation des cellules ciliées externes

Innervation afférente :

L'innervation afférente des CCE est assurée par les neurones ganglionnaires de type II (**Figure 2.8**). Ces derniers représentent une population minoritaire au sein du ganglion spiral: ils constituent à peine 5% de la population neuronale de cette structure (Spoendlin, 1969, 1972).

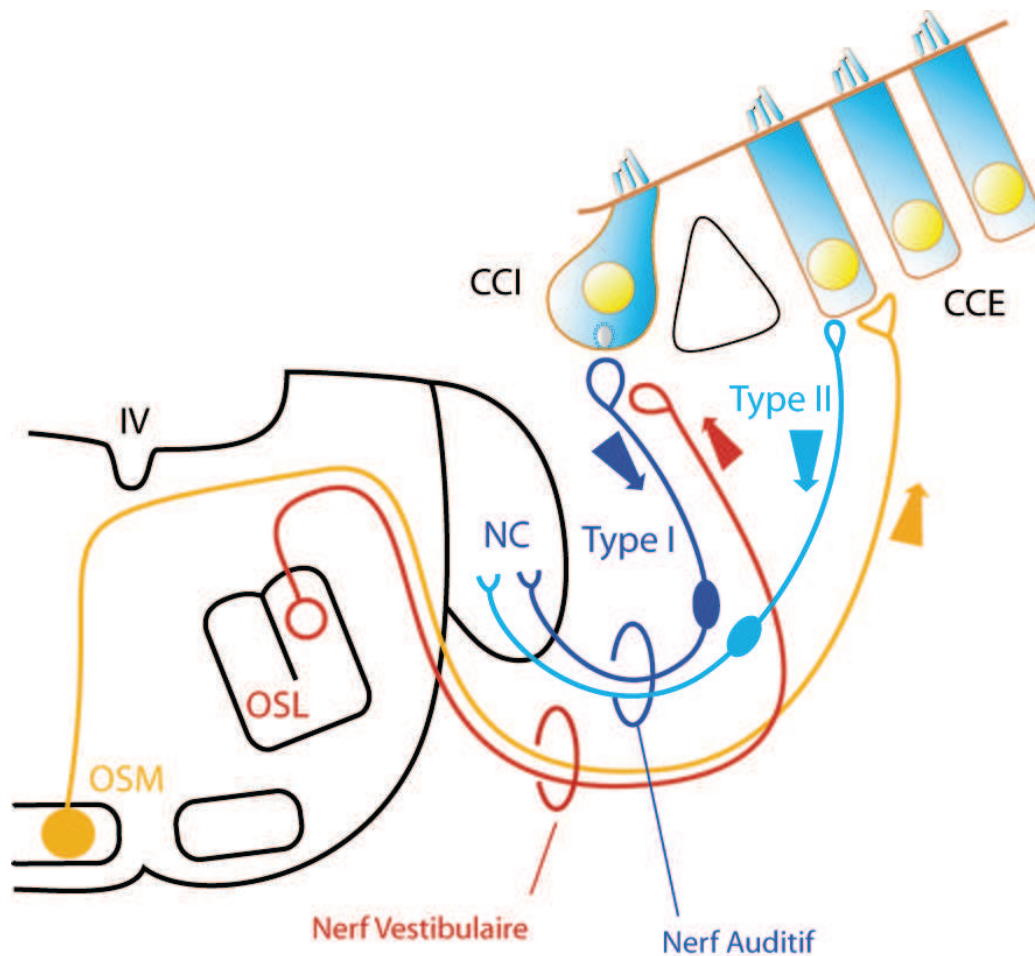


Figure 2.8 : Innervation de l'organe de Corti. Cette figure représente les connexions entre les cellules ciliées et le tronc cérébral. Les cellules ciliées internes (CCI) font synapse avec les neurones ganglionnaires de type I. Ces neurones forment le système afférent radial (représenté en bleu nuit) reliant la cochlée aux noyaux cochléaires (NC). Le système efférent latéral (représenté en rouge) est issu des neurones de l'olive supérieure latérale (OSL). Il innerve les dendrites des fibres afférentes connectées aux CCI. Les cellules ciliées externes (CCE) font synapse avec les neurones ganglionnaires de type II formant le système afférent spiral (représenté en bleu ciel). Les cellules ciliées externes sont directement innervées par le système efférent médian (représenté en jaune) dont les neurones proviennent du noyau ventro-médian du corps trapézoïde controlatéral, situé sur le pourtour du complexe olivaire supérieur médian (OSM).

Le diamètre et la surface du corps cellulaire des neurones de type II sont plus petits que ceux des neurones de type I, et contrairement à ces derniers ils ne sont pas myélinisés (Kiang et al., 1982). Le prolongement périphérique de ces neurones est ramifié. Chaque neurone de type II va ainsi établir des synapses avec une dizaine de CCE différentes, appartenant généralement à la même rangée. Récemment, la nature glutamatergique de ces synapses a été démontrée par l'enregistrement des terminaisons des fibres de type II (Weisz et al., 2012). En accord avec ces résultats, les CCE sont dotées de rubans présynaptiques (Knirsch et al., 2007).

Cependant, le rôle de l'innervation afférente des CCE reste controversé. Les neurones de type II ne semblent pas répondre aux stimulations sonores à forte intensité (Robertson, 1984), malgré une sensibilité à l'ATP, connu pour être libéré lors de traumatisme sonore.

Système efférent médiant :

L'innervation efférente des CCE est assurée par le système olivocochléaire efférent médian (**Figure 2.8**), appelé ainsi du fait de la présence des corps cellulaires des neurones dans le noyau ventro-médian du corps trapézoïde, sur le pourtour du complexe olivaire supérieur médian. Le contact entre les CCE et les neurones du système efférent médian s'effectue par l'intermédiaire de grosses terminaisons axoniques. Le neurotransmetteur utilisé par le système efférent médian est l'acétylcholine (Bobbin and Konishi, 1971, Housley and Ashmore, 1991, Kujawa et al., 1993, Erostequi et al., 1994, Kujawa et al., 1994, Blanchet et al., 1996, Oliver, 2000). Libérée par le système efférent médian, l'acétylcholine active des récepteurs nicotiques $\alpha 9$ et $\alpha 10$. Ces sous-unités nicotiques confèrent aux récepteurs des CCE un profil pharmacologique particulier : ces récepteurs sont bloqués par la strychnine (antagoniste glycinergique), par la bicuculline (antagoniste gabaergique), par la nicotine et la muscarine (Fuchs and Murrow, 1992, Kujawa et al., 1993, Elgoyhen et al., 1994, Erostequi et al., 1994, Kujawa et al., 1994, Elgoyhen et al., 2001). L'activation d' $\alpha 9$ - $\alpha 10$ par l'acétylcholine entraîne une entrée de calcium, qui à son tour active des canaux potassiques sensibles au calcium SK2 (Erostequi et al., 1994, Blanchet et al., 1996, Evans, 1996, Yuhas and Fuchs, 1999, Oliver, 2000). Ces derniers assurent la sortie de potassium et par conséquent entraînent l'hyperpolarisation des CCE.

En contrôlant le potentiel de membrane des CCE, le système efférent médian module l'activité de ces cellules, dont le rôle majeur est d'amplifier l'intensité des ondes sonores. La réduction du gain de l'amplificateur cochléaire permet au système efférent médian d'assurer une protection aux fortes intensités de stimulation (Puel et al., 1988, Maison et al., 2003). Notons aussi que le système efférent médian est également activé lors de processus d'attention sélective, qu'elle soit visuelle ou auditive (Puel et al., 1988, Froehlich et al., 1990, Puel and Rebillard, 1990, Winter et al., 1990, Meric and Collet, 1992).

2.3.1.2. Innervation des cellules ciliées internes

Innervation afférente :

L'innervation afférente des CCI est assurée par les neurones ganglionnaires de type I (**Figure 2.8**) également appelés neurones auditifs primaires ou fibres afférentes radiales. Ces neurones représentent 95 % de la population neuronale du ganglion spiral (Spoendlin, 1969). Ce sont des neurones myélinisés de grosse taille. Ils possèdent une branche périphérique unique, elle aussi myélinisée jusqu'à l'entrée de l'organe de Corti, qui projette vers les CCI et vient se connecter par un seul bouton dendritique à une seule CCI (Kiang et al., 1982). Plusieurs neurones de types I vont contacter une même CCI (en moyenne une dizaine par CCI chez l'homme). Ainsi, chez l'homme, il existe environ 30000 neurones de type I pour 3500 CCI. Au niveau de la densité post-synaptique des fibres de type I du nerf auditif, les récepteurs au glutamate de type AMPA se distribuent en anneau, avec pour centre la projection du ruban synaptique (Matsubara et al., 1998, Meyer et al., 2009). Les récepteurs AMPA des fibres de type I sont exclusivement composés par les sous-unités GluR 2-3 (Matsubara et al., 1998, Khimich et al., 2005, Nouvian et al., 2006).

Système efférent latéral :

Les fibres du système efférent latéral contactent directement les dendrites des neurones de type I, juste sous le bouton synaptique formé avec la CCI (**Figure 2.8**). Ces fibres efférentes sont originaires de l'olive supérieure latérale située dans le tronc cérébral. Le système efférent latéral utilise plusieurs neurotransmetteurs dont l'acétylcholine, le GABA, la dopamine, et des neuromodulateurs dont le CGRP, les enképhalines et les dynorphines (Eybalin, 1993, Puel, 1995). Son rôle fonctionnel est peu connu, mais il semble modifier l'activité des fibres afférentes et pourrait protéger l'oreille d'une surexposition sonore (Darrow et al., 2007) et/ou équilibrer la sensibilité des deux oreilles (Darrow et al., 2006).

2.3.2. Neurones auditifs primaires

2.3.2.1. Morphologie

Les neurones auditifs primaires sont composés d'un axone périphérique, qui innerve une cellule ciliée interne, d'un corps cellulaire, localisé dans le ganglion spiral, et d'un axone central qui s'étend du corps cellulaire aux noyaux cochléaires. Les axones centraux convergent vers le modiolus pour former le nerf auditif. Les neurones issus de l'apex sont positionnés au centre du nerf alors que les neurones issus de la base sont distribués en périphérie. Les neurones qui innervent la base de la cochlée et qui codent les fréquences aiguës sont plus courts que les neurones qui innervent l'apex (~4 mm contre ~8 mm chez le chat). C'est la raison pour laquelle les corps cellulaires des neurones de l'apex sont plus volumineux (section longitudinale ~ 350 μm^2) et plus allongés (grand axe / petit axe ~ 0.8) que les neurones de la base (section longitudinale ~ 250 μm^2 ; grand axe / petit axe ~ 0.6) (Liberman and Oliver, 1984).

L'axone périphérique se distingue de l'axone central par sa longueur (10 à 20 fois plus courte, (Liberman and Oliver, 1984) et son plus petit diamètre (rapport des diamètres central/périphérie de l'ordre de 4 (Kiang et al., 1982, Liberman and Oliver, 1984)). L'axone central et le corps cellulaire sont intégralement myélinisés, contrairement à l'axone périphérique qui est myélinisé uniquement du corps cellulaire à l'habenula perforata. Des mesures acquises chez le chat ont montré que l'axone périphérique compte 3 segments myélinisés de 150 à 200 μm l'unité contre 7 à 12 segments myélinisés de 300 à 400 μm l'unité pour l'axone central. Les segments myélinisés sont séparés par un nœud de Ranvier d'un micromètre de longueur et caractérisé par un rétrécissement du diamètre du neurone (Liberman and Oliver, 1984). Les nœuds de Ranvier qui bordent le corps cellulaire sont plus longs et peuvent atteindre une dizaine de micromètres de longueur. Le site d'initiation des potentiels d'action des neurones auditifs primaires est localisé dans la terminaison périphérique à proximité de l'habenula perforata (Siegel, 1992, Hossain et al., 2005, Rutherford et al., 2012).

Il a été montré que les caractéristiques morphologiques des neurones auditifs primaires pouvaient être reliées à leur activité spontanée. Un neurone à basse activité spontanée est caractérisé par : i) une innervation de la CCI côté modiolus, ii) une faible densité de récepteurs post-synaptiques, iii) un petit diamètre axonal et iv) peu de mitochondries. Tandis

qu'un neurone à haute activité spontanée est caractérisé par : i) une innervation de la CCI côté pilier, ii) une forte densité de récepteurs post-synaptiques, iii) un plus gros diamètre axonal et iv) beaucoup de mitochondries (Liberman, 1982, Merchan-Perez and Liberman, 1996, Grant et al., 2010, Liberman et al., 2011). Ce gradient pilier/modiolus est maintenu jusqu'au ganglion spiral. Les corps cellulaires des neurones à basse et moyenne activité spontanée sont localisés du côté de la rampe vestibulaire alors que les neurones à haute activité spontanée sont uniformément distribués dans le ganglion spiral (Kawase and Liberman, 1992, Tsuji and Liberman, 1997).

Les projections centrales de ces différents groupes de neurones sont elles aussi différentes. Tous les neurones projettent sur les noyaux cochléaires, mais les neurones à basse activité spontanée ont un plus grand nombre de terminaisons nerveuses destinées à une innervation préférentielle de la région périphérique des petites cellules (Ryugo and Rouiller, 1988, Liberman, 1991). Nous verrons par la suite que les différences morphologiques des fibres à basse- et à haute- activité spontanée, s'accompagnent de différences fonctionnelles.

2.3.2.2. Enregistrements unitaires

Les premiers enregistrements de l'activité unitaire d'un neurone cochléaire ont été réalisés par (Tasaki, 1954) chez le cochon d'inde et par (Katsuki et al., 1958) chez le chat. En général, chez les mammifères, les résultats obtenus sur une espèce peuvent être extrapolés à une autre espèce car les propriétés des réponses unitaires sont comparables. Il faut noter que la plupart, si ce n'est la totalité des enregistrements sont effectués sur des neurones provenant des cellules ciliées internes, car ils constituent près de 95% du nerf auditif (Spoendlin, 1969, 1972). L'amplitude des réponses enregistrées est de l'ordre du millivolt (mV).

La plupart des fibres présentent une activité spontanée dont le rythme de décharge peut aller jusqu'à plus d'une centaine de potentiels d'action (PA) par seconde. L'intervalle de temps séparant deux PA est aléatoire (Poisson), avec une durée minimale d'environ une milliseconde, en raison de la période réfractaire des fibres. L'enregistrement des neurones auditifs primaires chez le chat (Liberman, 1978) a montré qu'ils peuvent être classés en 3 groupes fonctionnels selon leur activité spontanée (AS).

On distingue ainsi les neurones à haute-AS (> 18 PA/s), dont l'activité augmente dès les bas niveaux de stimulation, les neurones à basse-AS ($< 0,5$ PA/s), dont l'activité n'augmente qu'à hauts niveaux de stimulation, et les neurones à moyenne-AS ($0,5 \leq AS \leq 18$ PA/s), présentant des propriétés de codage intermédiaires. La distribution des neurones auditifs primaires selon cette classification est relativement homogène entre espèce (voir **Table 2.1**) avec une forte majorité de fibres à haute activité spontanée (60 - 75%) et une minorité de fibres à basse activité (10 - 16%). Il n'existe pas de données expérimentales chez l'homme. Comme précisé précédemment, ces différents groupes fonctionnels sont liés à l'hétérogénéité des synapses à ruban (**Figure 2.7**).

L'activité spontanée des fibres auditives primaires pourrait également être régulée par les fibres efférentes. En effet, l'application intra cochléaire de dopamine (neurotransmetteur du système efférent latéral) entraîne une réduction de l'activité spontanée des fibres du nerf auditif et une élévation du seuil de réponse à la stimulation sonore (Ruel et al., 2001, Le Prell et al., 2003). À l'inverse, l'application d'antagonistes de la dopamine provoque une augmentation de l'activité spontanée des neurones auditifs primaires et une amélioration de la sensibilité au seuil. Dans cette dernière expérience, l'augmentation de l'activité spontanée reflète probablement une levée d'inhibition tonique au niveau du site d'initiation du message auditif (Ruel et al., 2001).

Table 2.1 : Distribution des fibres du nerf auditif chez différentes espèces. Distribution des fibres suivant la classification basée sur l'activité spontanée. (haute : $AS > 18$ PA/s, moyenne : $0,5 \leq AS \leq 18$ PA/s, basse : $AS < 0,5$ PA/s). Données acquises par la technique d'enregistrement unitaire.

| Animal | Fibres | Haute-AS | Moyenne-AS | Basse-AS | Référence |
|---------------|--------|----------|---------------------|----------|-------------------------------|
| Chat | 55000 | 61 % | 23 % | 16 % | (Liberman, 1978) |
| Cochon d'inde | 24000 | 73 % | 15 % | 12 % | (Tsuji and Liberman, 1997) |
| Gerbille | 18000 | 60 % | 30 % | 10 % | (Schmiedt, 1989) |
| Souris | 9000 | 51 % | 49 (AS < 20 PA/s) | | (Taberner and Liberman, 2005) |

2.3.2.3. Réponses des fibres en fonction de la fréquence

En général, les fibres auditives répondent à une stimulation sonore par une modification (normalement une augmentation) de leur rythme de décharge au-dessus de leur activité spontanée. Chaque fibre du nerf auditif répond préférentiellement à une fréquence bien définie, appelée Fréquence Caractéristique (FC), qui dépend de la localisation de la CCI qu'elle innerve sur la membrane basilaire (carte tonotopique cochléaire). Aux plus bas niveaux de stimulation, la fibre ne répond qu'à cette fréquence de stimulation. Cependant, à mesure que le niveau de stimulation s'élève, la fibre répond à une plus grande gamme fréquentielle. On peut ainsi définir un domaine de réponse de la fibre, dans le plan fréquence-intensité, qui est délimité par une courbe de seuil représentant le niveau d'intensité nécessaire, à chaque fréquence, pour provoquer une augmentation du rythme de décharge de la fibre au-dessus de son activité spontanée (**Figure 2.9**).

À la fréquence caractéristique de la fibre, cette courbe de seuil, appelée "courbe d'accord" est basse et très pointue. Cette sélectivité en fréquence reflète celle du potentiel de récepteur de la CCI qu'elle innerve (Cf. **Figure 2.5**). Chaque fibre peut être considérée comme la sortie d'un filtre sélectif passe-bande, et l'ensemble du nerf cochléaire comme un faisceau issu d'un réseau de tels filtres. La grande sélectivité de ces filtres joue un rôle important dans l'analyse fréquentielle effectuée par la cochlée.

Pour les fibres de fréquence caractéristique supérieure à 2 kHz, les courbes d'accord sont asymétriques. Du côté des hautes fréquences, la pente quasi-verticale traduit l'absence de réponse pour des fréquences supérieures à la FC, même à des hauts niveaux d'intensité. Par contre, du côté des basses fréquences, la pente de la courbe d'accord est plus faible, jusqu'à présenter un plateau (queue d'activité) aux fortes intensités (**Figure 2.9**). Ainsi, une fibre basale, spécialisée à bas niveaux de stimulation dans le codage des hautes fréquences, peut également répondre aux basses fréquences de stimulation lorsqu'elles sont émises à forte intensité (propriétés liées aux caractéristiques physiques de la membrane basilaire). À hauts niveaux de stimulation, la perte de sélectivité fréquentielle des mécanismes cochléaires induit une forte augmentation du nombre de fibres recrutées par la stimulation et une dégradation de l'analyse fréquentielle du message sonore.

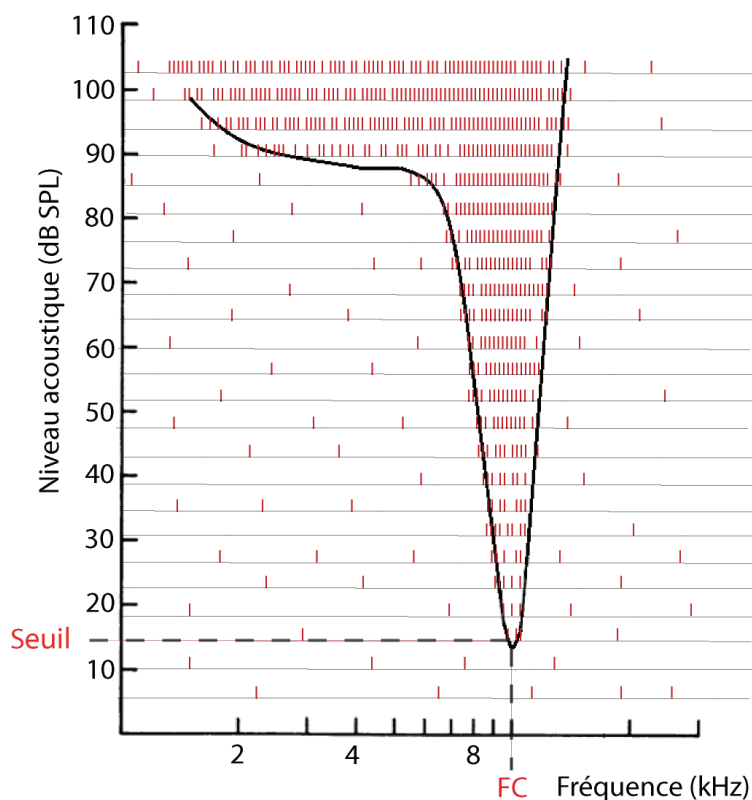


Figure 2.9: Schéma représentant la forme d'une courbe d'accord (courbe de seuil) pour une fibre de fréquence caractéristique (FC) égale à 10 kHz. Cette figure schématise le domaine de réponse d'une fibre dans le plan fréquence-intensité. La courbe noire correspond à la courbe de seuil représentant le niveau d'intensité nécessaire, à chaque fréquence, pour provoquer une augmentation du rythme de décharge de la fibre au-dessus de son activité spontanée. Les tirets rouges représentent les potentiels d'action émis par la fibre. Plus ils sont rapprochés, plus le taux de décharge de la fibre est élevé. À mesure que le niveau de stimulation s'élève, la fibre répond à une plus large gamme de fréquences. (Schéma inspiré de (Evans and Klinke, 1982))

Pour les basses fréquences de stimulation, le codage fréquentiel est accentué par une synchronisation des décharges à chaque cycle de l'onde sonore. La réponse temporelle des fibres véhicule alors une information fréquentielle.

2.3.2.4. Réponses des fibres en fonction du temps

Pour les basses fréquences de stimulation, le potentiel de récepteur des CCI conserve une composante alternative (microphonique) reproduisant la fréquence du stimulus. Cette composante alternative dépolarise la CCI durant les phases acoustiques de raréfaction et l'hyperpolarise durant les phases de condensation. Il en résulte une libération accrue du neurotransmetteur, donc une accélération des décharges durant la phase de raréfaction, et une rétention du neurotransmetteur, donc une diminution de l'activité spontanée de la fibre, lors de la phase de condensation. Ainsi, les potentiels d'action générés par la fibre se concentrent autour des phases de raréfaction de l'onde sonore (phénomène de verrouillage de phase).

Pour les basses fréquences de stimulation, les potentiels d'action peuvent être émis à chaque cycle de l'onde sonore, ou de façon plus espacée mais toujours dans la même phase de l'onde sonore (**Figure 2.10A**). Les intervalles de temps séparant les potentiels d'action correspondent alors approximativement aux multiples entiers de la période du stimulus acoustique. C'est en sommant les décharges émises par les différentes fibres répondant à la stimulation que le système nerveux détecte une fréquence de décharge identique à celle de la stimulation sonore (Rose et al., 1967).

Pour les hautes fréquences de stimulation, la composante alternative (microphonique) du potentiel de récepteur des CCI est filtrée par les propriétés électriques de la membrane cellulaire (**Figure 2.5B**). Elle fait place à une composante continue qui dépolarise la cellule pendant toute la durée de la stimulation. Après une forte synchronisation du premier potentiel d'action évoqué par la stimulation (**Figure 2.10B**), le taux de décharge de la fibre diminue puis devient globalement constant pendant toute la durée de la stimulation.

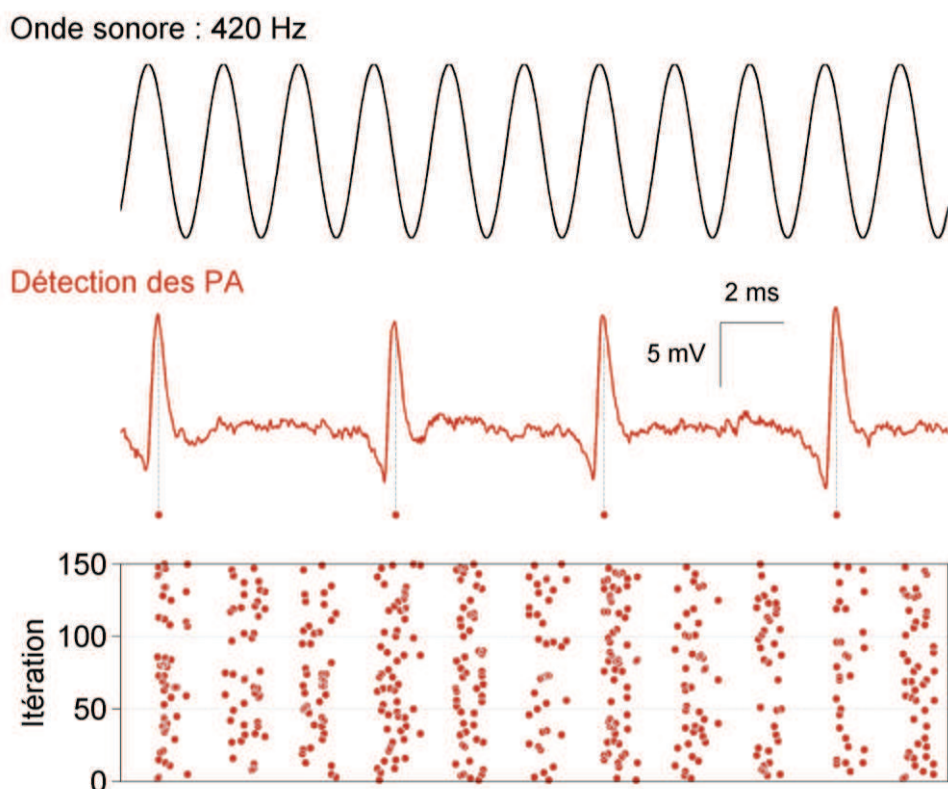


Figure 2.10 : Verrouillage de phase pour les basses fréquences de stimulation. Cet exemple présente l'activité unitaire d'une fibre enregistrée pendant la présentation d'une bouffée tonale de 420 Hz, émise à 60 dB SPL. Les points rouges représentent les instants de détection des potentiels d'action (PA) émis par la fibre lors des 150 itérations de la stimulation (enregistrements réalisés dans l'équipe chez une gerbille).

Pour les hautes fréquences de stimulation (**Figure 2.10B**), la forte synchronisation du premier potentiel d'action évoqué en début de stimulation reflète la libération rapide du contingent de vésicules arrimées à la membrane plasmique (Readily Releasable Pool - (Moser and Beutner, 2000)). Le passage à une activité plus aléatoire mais globalement soutenue reflète la libération continue de vésicules plus éloignées des zones actives (Slowly Releasable Pool). L'étude du codage temporel des fibres auditives peut ainsi nous donner des indications sur les mécanismes de libération du neurotransmetteur par la CCI. On parle d'adaptation pour désigner la diminution du taux de décharge de la fibre observée après la réponse synchrone des premiers potentiels d'action évoqués.

La réponse temporelle d'une fibre peut s'étudier sous la forme d'un histogramme temporel représentant l'évolution du taux de décharge d'une fibre en fonction du temps. Cet histogramme (*PSTH: Peri-Stimulus Time Histogram*) est construit à partir par des trains de PA générés par une fibre lors d'une stimulation itérative. Avant le début de la stimulation, ce PSTH représente l'activité basale (*AB*) de la fibre (**Figure 2.11**). Pour des stimulations rapprochées dans le temps, cette activité basale aura tendance à être inférieure à l'activité spontanée de la fibre. En réponse à une haute fréquence de stimulation, le PSTH d'une fibre auditive met en évidence: une rapide augmentation du taux de décharge en début de stimulation (*Pic*), suivie d'une rapide diminution d'activité (*Adaptation*), puis un taux de décharge maintenu constant pendant toute la durée de la stimulation (*Plateau*). À la fin de la stimulation, on observe une inhibition d'activité, avec un taux de décharge qui peut rester nul pendant plusieurs millisecondes. Par la suite la fibre retrouve progressivement son niveau d'activité basale (*Récupération*).

Lorsque l'intervalle de temps compris entre deux stimulations est suffisamment long pour permettre à la fibre de récupérer son activité spontanée, l'activité basale du PSTH est égale à l'activité spontanée de la fibre. Notons que le temps de récupération des fibres à basse activité spontanée est beaucoup plus long que celui des fibres à haute activité spontanée. Chez le chinchilla, pour un son pur présenté à 80 dB SPL pendant 100 ms, l'étude de (Relkin and Doucet, 1991) estime le temps de récupération des fibres à basse-AS à 2 secondes, contre 200 millisecondes pour les fibres à haute-AS. Cette observation pourrait en partie expliquer pourquoi le pic des PSTH est plus petit pour les fibres à basse-AS que pour les fibres à haute-AS (Rhode and Smith, 1985, Muller and Robertson, 1991).

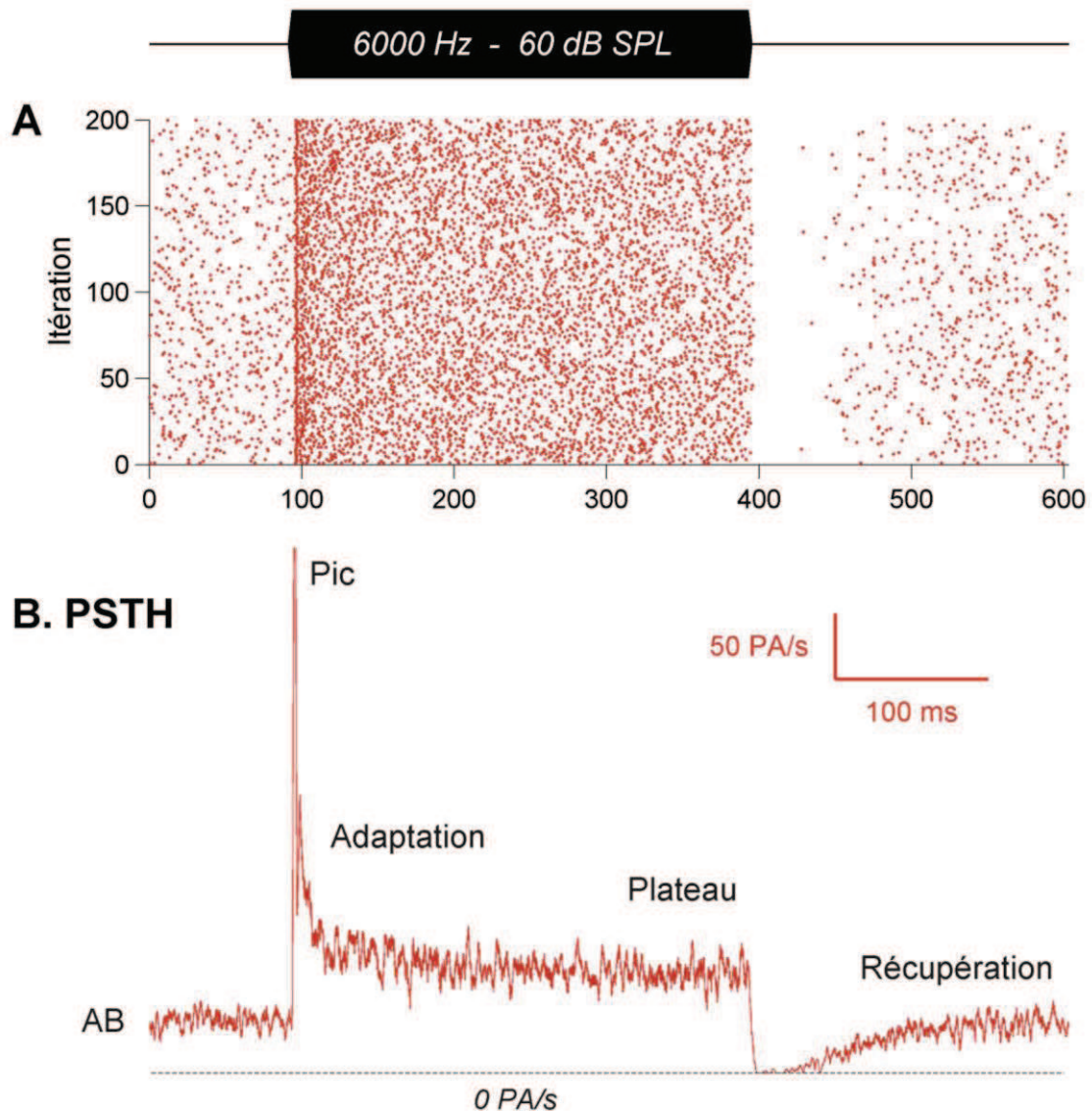


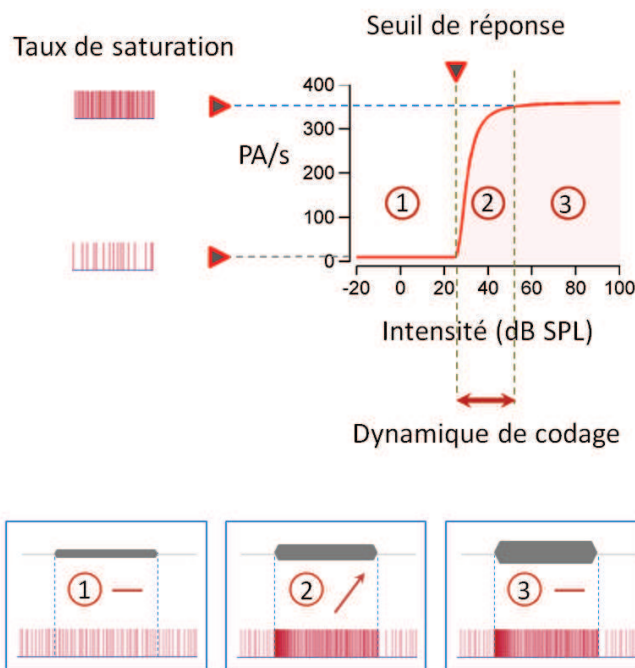
Figure 2.11 : Histogramme temporel de décharge d'une fibre. **A:** Les points rouges représentent les instants de détection des potentiels d'action émis par la fibre lors des 200 premières itérations de la stimulation (montée=descente=2,5 ms, durée=300 ms, intervalle-inter stimulation=300 ms, 500 présentations). Les potentiels d'action détectés avant le début de chaque stimulation mettent en évidence le niveau d'activité basale de la fibre, proche de son niveau d'activité spontanée (AS=42 PA/s). **B:** L'histogramme temporel de décharge de la fibre (*PSTH: Peri-Stimulus Time Histogram*) est construit à partir des PA détectés au cours des 500 présentations de la stimulation, avec un pas temporel égal à 2 ms. Avant le début de la stimulation, ce PSTH met en évidence le niveau d'activité basale (AB) de la fibre. La ligne pointillée horizontale représente le taux de décharge égal à 0 PA/s (enregistrements réalisés dans l'équipe chez une gerbille).

2.3.2.5. Réponses des fibres en fonction de l'intensité

Le codage en intensité d'une fibre est généralement représenté par une courbe entrée-sortie mettant en évidence l'évolution du taux de décharge de la fibre avec l'augmentation du niveau de stimulation acoustique (**Figure 2.12A**). On distingue généralement 3 phases

d'évolution: (1) Tant que le niveau de stimulation est inférieur au seuil de réponse de la fibre, celle-ci reste à son niveau d'activité spontanée. Autrement dit, la fibre ne répond pas à la stimulation et ce malgré l'augmentation du niveau de stimulation. (2) Lorsque le niveau de stimulation dépasse le seuil de réponse de la fibre, le taux de décharge de la fibre augmente avec le niveau de stimulation. La fibre participe alors au codage de l'intensité sonore. Mais rapidement, (3) le taux de décharge de la fibre atteint un niveau de saturation qui n'évolue plus avec le niveau de stimulation. Autrement dit, la dynamique de codage en intensité d'une fibre (20 à 40 dB) est très limitée par rapport à la dynamique en intensité du champ audible (environ 100 dB).

A. Etude du codage en intensité



B. Classification fonctionnelle

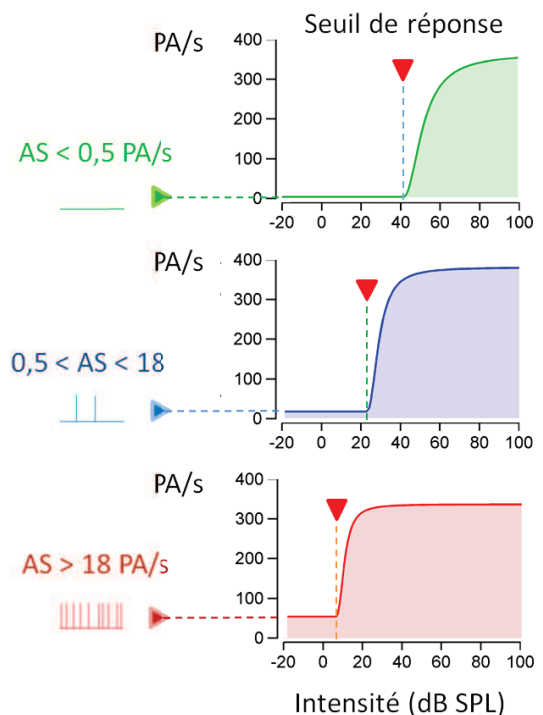


Figure 2.12 : Codage en intensité des fibres auditives. **A.** Etude du codage en intensité d'une fibre auditive. L'évolution du taux de décharge d'une fibre auditive en fonction de l'intensité acoustique de stimulation est généralement représentée par une fonction sigmoïde. Tant que le niveau de stimulation acoustique est inférieur au seuil de réponse de la fibre (1), celle-ci reste à son niveau d'activité spontanée. Lorsque le niveau de stimulation dépasse le seuil de réponse de la fibre (2), le taux de décharge de la fibre augmente avec le niveau de stimulation. Mais rapidement, le taux de décharge de la fibre atteint un niveau de saturation (3) qui n'évolue plus avec le niveau de stimulation. **B.** Les fibres à haute activité spontanée ($AS > 18$ PA/s, rouge) codent les bas niveaux de stimulation, les fibres à basse activité spontanée ($AS < 0,5$ PA/s, vert) codent les plus hauts niveaux de stimulation, et les fibres à moyenne activité spontanée ($0,5 < AS < 18$ PA/s, bleu) codent les niveaux intermédiaires (Liberman, 1978).

Pour assurer le codage de l'ensemble de la dynamique auditive, chaque cellule ciliée interne est innervée, selon l'espèce étudiée, par 10 à 30 fibres afférentes. Ainsi, outre l'augmentation du rythme de décharge des fibres, une augmentation d'intensité entraîne le recrutement de nouvelles fibres. À bas niveaux, la stimulation recrute progressivement les fibres présentant une fréquence caractéristique similaire à celle de l'onde sonore, en commençant par les fibres à bas seuils (fibres à haute-AS, **Figure 2.12B**), puis les fibres à plus hauts seuils (moyenne- et basse-AS, **Figure 2.12B**). À hauts niveaux de stimulation, la perte de sélectivité fréquentielle induit le recrutement d'un grand nombre de fibres innervant la base de la cochlée.

2.3.3. Potentiels électriques globaux

Les réponses décrites jusqu'à présent sont les réponses unitaires obtenues chez l'animal grâce à une microélectrode placée de façon invasive au contact d'une fibre auditive. Chez l'homme, seuls les potentiels électriques globaux peuvent être enregistrés pour étudier l'activité des fibres auditives. L'observation de ces réponses globales est plus facile (approche peu invasive) et permet de réaliser une évaluation tonotopique de l'ensemble des fibres auditives.

2.3.3.1. Potentiel d'action composite

Le potentiel d'action composite du nerf auditif peut être enregistré chez l'homme au moyen d'une électrode placée dans le conduit auditif externe, ou mieux (avec un gain de 10) par une électrode transtympanique s'appuyant sur le promontoire de la cochlée (Aran J.M., 1969). Ce potentiel d'action composite (PAC) représente la sommation des activités unitaires d'un grand nombre de fibres en début de stimulation. Il est donc d'autant plus ample que les réponses unitaires sont nombreuses et bien synchronisées.

En réponse à un clic large bande, l'activité des fibres provenant de la base (région des hautes fréquences) est plus synchronisée que celle des fibres provenant de l'apex. Ainsi, la contribution des fibres basales dans l'élaboration du PAC est prépondérante. Cependant, en utilisant des stimulations plus spécifiques en fréquence, telles que des bouffées tonales, on peut interroger sélectivement différentes fréquences. D'une manière générale, on peut dire que la forme du PAC résulte du produit complexe, dans le temps (convolution) de deux

fonctions (Goldstein and Kiang, 1958) : d'une part, celle qui décrit la forme d'un potentiel d'action unitaire telle qu'il apparaît au niveau de l'électrode d'enregistrement (par exemple, la fenêtre ronde chez l'animal, le promontoire chez l'homme) et d'autre part, celle qui décrit, statistiquement, le nombre de ces potentiels d'action unitaires apparaissant à chaque instant après la stimulation sonore (histogramme temporel de décharge).

L'enregistrement de l'activité cochléaire (électrocochléographie) permet d'étudier les réponses des cellules ciliées et des neurones cochléaires indépendamment des processus auditifs centraux. Comme pour tous les potentiels électriques globaux, il est important de prendre certaines précautions pour isoler la réponse neurale (absence de coexistence d'un artefact de stimulation et/ou d'une réponse sensorielle (Starr et al., 1991)). Cependant, ce traitement de signal est plus facile à réaliser à partir des réponses cochléaires, plus amples et plus sensibles à l'activité des neurones cochléaires, que les potentiels de surface. Notons également que le risque de transfert crânien (réponse de l'oreille controlatérale) est négligeable par rapport à celui rencontré avec l'enregistrement des potentiels de surface.

Ainsi, bien que le PAC forme la composante principale du complexe de l'onde I des potentiels évoqués auditifs précoces, il reste plus facile à analyser que cette dernière. L'amplitude du PAC, mesurée entre ses deux premières ondes N_1 et P_1 , est de l'ordre de quelques dizaines de microvolts. Moins d'une centaine de répétitions sont nécessaires pour éliminer par moyennage le bruit de fond parasite.

2.3.3.2. Potentiels évoqués auditifs précoces (PEAP)

Ces potentiels de surface (électrode placée au niveau du crâne) permettent d'enregistrer 5 ondes majeures. La première, avec une latence d'environ 1 ms, reflète le potentiel du nerf auditif; les autres, celles des noyaux relais du tronc cérébral. Si la technique d'enregistrement de l'onde I des PEAP est moins invasive que celle du PAC, le potentiel du nerf auditif ainsi obtenu est plus délicat à analyser. En effet, les PEAP sont de faible amplitude ($< \mu V$) et nécessitent un moyennage important (1000 à 2000 répétitions) pour être extraits du bruit de fond.

Généralement évoqués par une succession de clics (jusqu'à 50 clics par seconde), la réponse globale recueillie provient essentiellement de la base de la cochlée. L'apparition de

l'onde V permet d'estimer un seuil auditif, attribué aux fréquences comprises entre 2000 et 4000 Hz, et l'étude des latences et des amplitudes des 5 ondes permet de détecter des lésions sur les voies auditives. Dans les atteintes centrales, l'indication essentielle est obtenue par l'augmentation du temps de conduction centrale mesuré par l'écart entre l'onde I (ou N₁ du PAC) et l'onde V du tronc cérébral (Portmann et al., 1980).

Les PEAP sont au cœur de la définition opérationnelle des neuropathies auditives dont le dépistage repose sur la démonstration d'une abolition ou d'une altération majeure des PEAP incluant l'onde I, avec la préservation de la réponse des cellules ciliées externes (Starr et al., 1996).

2.3.3.3. Potentiels stationnaires (ASSR)

Les ASSR diffèrent significativement de l'ensemble des potentiels électriques globaux, dits transitoires, discutés jusqu'à présent parce qu'ils sont évoqués par des stimuli de longue durée. Ces stimuli consistent en une fréquence porteuse (la fréquence audiométrique à tester) modulée en amplitude et/ou en fréquence à des rythmes de quelques dizaines à une centaine de Hz. Les ASSR reflètent la décharge synchrone des neurones auditifs accordés sur la fréquence porteuse, mais en synchronisant leur décharge sur la fréquence de modulation (Kuwada et al., 1986). Ils proviennent du cortex auditif et de l'étage mésencéphalique du tronc cérébral.

Reposant sur des stimuli de longue durée, ils possèdent une spécificité fréquentielle compétitive par rapport aux bouffées tonales (Cone-Wesson et al., 2002) et bien évidemment incomparablement meilleure que le clic. Les potentiels stationnaires ne peuvent être utilisés pour évaluer les seuils comportementaux mais ils contribuent à enrichir le tableau électrophysiologique des potentiels globaux.

3. MATERIEL ET METHODES

Les expériences ont été menées chez des gerbilles de Mongolie âgées de 7 semaines, provenant du centre d'élevage Charles River (L'Arbresle, France). Ces animaux étaient hébergés au sein de l'animalerie de l'Institut des Neurosciences de Montpellier qui possède l'agrément du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (B-34 172 36 -11 Mars 2010). Les expériences ont été conduites dans le souci de minimiser le nombre et la souffrance des animaux. L'audition des animaux a été explorée à l'aide des produits de distorsion acoustiques, des potentiels cochléaires globaux et de l'activité unitaire des fibres auditives. Ces réponses ont été comparées à l'analyse quantitative du nombre de synapses à ruban par CCI, chez des cochlées contrôles et des cochlées exposées à 33 μ M de ouabaïne.

3.1. Préparation des drogues

Deux drogues ont été utilisées dans cette étude. La ouabaïne (Sigma, St. Louis, MO, USA), molécule connue pour son inhibition de la pompe Na⁺K⁺-ATPase (Schmiedt et al., 2002), était diluée avant chaque utilisation dans de la périlymphe artificielle pour atteindre une concentration finale de 33 μ M. La tétrodotoxine (TTX, LATOXAN), neurotoxine connue pour bloquer de manière très sélective le pore des canaux sodium voltage-dépendants (Katsuki et al., 1966), a été diluée dans la périlymphe artificielle pour une concentration finale de 1 et 3 μ M. La composition de la périlymphe artificielle était la suivante: 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 1 mM NaHCO₃; 11 mM glucose; pH 7,4; osmolarité (304 \pm 4,5 mOsm/kg).

3.2. Implantation des électrodes et application des drogues

Pour limiter le nombre et la durée des actes chirurgicaux, une électrode d'enregistrement était implantée à demeure dans la niche de la fenêtre ronde, puis reliée à un connecteur fixé sur le crâne de l'animal. À l'occasion de cette chirurgie, une drogue pouvait être appliquée dans la niche de la fenêtre ronde.

Les gerbilles étaient endormies avec un mélange de Rompun à 2% (3 mg/kg) et de Zolétil 100 (40 mg/kg) injecté par voie intra péritonéale. L'approche de la cochlée était

réalisée par un abord dorsal. Après avoir rasé et nettoyé le crâne de l'animal avec un antiseptique (Bétadine®), la peau était incisée derrière le pavillon de l'oreille gauche pour mettre en évidence la bulle tympanique. Une fois dégagé et séché, l'os de la bulle tympanique était ouvert à l'aide d'un scalpel au niveau de sa paroi supérieure. Une électrode boule d'enregistrement, préparée à partir d'un fil de platine gainé de Téflon (0,13 mm de diamètre, Phymep, France), était ensuite placée au contact de la niche de la fenêtre ronde à l'aide d'un micromanipulateur (Warner Instruments). Pour conserver cette électrode en place pendant plusieurs jours, celle-ci était fixée au niveau de la bulle tympanique avec de la résine dentaire (Réf. 4920A2, 3M ESPE). Après avoir placé une électrode de référence dans les muscles de la nuque de l'animal, une première série de mesures était réalisée en per-opératoire. Les seuils et l'amplitude des réponses cochléaires étaient alors contrôlés.

À ce stade, une drogue (Ouabaïne ou TTX) pouvait être appliquée dans la niche de la fenêtre ronde. Elle était introduite dans une pipette de perfusion en verre (0,1 mm de diamètre à la pointe) placée au-dessus de la niche de la fenêtre ronde. Connectée à un pousse seringue électrique (Warner Instruments), cette pipette de perfusion permettait de délivrer la drogue dans la niche de la fenêtre ronde à une vitesse programmée de 2 ml/h, pendant 30 minutes pour l'ouabaïne, et 20 mn pour la TTX. Après application, la drogue était retirée de la niche de la fenêtre ronde à l'aide d'une petite boule de coton. Une seconde série de mesure pouvait alors être réalisée pour étudier l'effet immédiat de la drogue appliquée.

Pour tous les animaux implantés, la bulle tympanique était ensuite séchée et refermée avec de la résine dentaire de manière à garder une extrémité de l'électrode d'enregistrement en contact avec la niche de la fenêtre ronde, et l'autre extrémité en dehors de la bulle tympanique. Une incision était ensuite effectuée sur le crâne de l'animal afin d'y fixer un connecteur. Après avoir gratté le périoste de l'os, cette zone était soigneusement séchée et légèrement érodée avec du nitrate d'argent. Les électrodes (active et de référence) étaient ensuite glissées sous la peau jusqu'à l'ouverture effectuée sur le crâne, afin d'y être soudées au connecteur (fiche femelle à 4 voies, HARWIN). Le connecteur était alors fixé sur le crâne de l'animal avec de la résine dentaire. Pour finir, les plans musculaires et cutanés étaient suturés avec du fil résorbable et recouverts avec un antiseptique (Bétadine®). Après cette chirurgie, les animaux étaient laissés au repos pendant une semaine avant de commencer les procédures d'exploration fonctionnelle.

3.3. Exploration fonctionnelle

Avant chaque expérimentation, les gerbilles étaient endormies avec un mélange de Rompun à 2% (3 mg/kg) et de Zolétil 100 (40 mg/kg) injecté par voie intra péritonéale. Cette anesthésie présentait l'avantage de se dissiper rapidement et pouvait être maintenue pendant plusieurs heures grâce à l'injection régulière (toutes les deux heures) du tiers de la dose initiale. Toutes les procédures étaient ensuite réalisées dans une chambre anéchoïque insonorisée. La température corporelle des animaux était maintenue à $38 \pm 1^\circ\text{C}$ au moyen d'une couverture chauffante rétro-contrôlée par une sonde rectale (Homeothermic blanket control unit 7137, Phymep). Pour assurer le dégagement des voies respiratoires des animaux, leur tête était positionnée dans un appareil de contention non invasif fabriqué dans le laboratoire.

3.3.1. Produits de distorsion acoustiques

L'amplification mécanique non linéaire, créée par l'activité des CCE, a été étudiée à travers l'enregistrement des produits de distorsion acoustiques. Deux sons de fréquences primaires f_1 et f_2 étaient générés simultanément par le logiciel Cubdis HID 40133DP (Mimosa Acoustics, Champaign, IL, USA), et délivrés dans le conduit auditif externe par une sonde ER-10C S/N 2525 (Etymotic Research Inc. Elk Grove Village, IL, USA) possédant deux hauts parleurs miniatures. Les mécanismes actifs étaient explorés le long de l'axe tonotopique en faisant varier la fréquence f_2 de 500 Hz à 20 kHz, par pas de 1/4 d'octave, en gardant un rapport de fréquence $f_2/f_1=1,2$. Les fréquences primaires f_1 et f_2 étaient émises à 60 et 55 dB SPL (réf. 20 μPa), respectivement. Un microphone miniature inclus dans la sonde intra-auriculaire, permettait d'enregistrer les produits de distorsion acoustiques. Le pic de distorsion cubique $2f_1-f_2$ et le bruit de fond environnant ont été mesurés en fonction de la fréquence f_2 . Ce pic de distorsion cubique présente l'avantage d'être le pic de distorsion le plus ample aux fréquences plus graves que les fréquences primaires, ce qui permet d'explorer la cochlée dans les fréquences aigues.

3.3.2. Potentiels cochléaires

Les potentiels cochléaires étaient recueillis par simple branchement au connecteur placé sur le crâne de l'animal pendant l'implantation des électrodes (section 3.2). La

génération et l'acquisition des signaux étaient assurées par une carte d'analyse de signaux dynamiques à deux entrées et deux sorties (National Instruments® PXI-4461, 200 kHz/canal, 120 dB de dynamique), contrôlée par des interfaces créées au laboratoire sous LabVIEW (National Instruments®). Les signaux étaient générés à une cadence de 200 000 échantillons/sec, tandis que l'acquisition était réalisée à 50 000 échantillons/sec pour l'enregistrement de l'activité synchrone (PAC, PSTR et activité unitaire) et à 8000 échantillons/sec pour l'enregistrement de l'activité soutenue du nerf auditif (bruit de fond cochléaire spontané et évoqué). Les stimulations sonores étaient délivrées en champ libre par l'intermédiaire d'un haut-parleur (James B. Lansing Sound, Los Angeles, CA, USA) placé à 10 cm de l'oreille testée. La calibration du système acoustique était réalisée à l'aide d'un microphone 1/4 de pouce (Bruel et Kjaer) relié à un analyseur de spectre (HP 3561A) préalablement étalonné en dB SPL (référence 20 μ Pa efficace).

3.3.2.1. Potentiel d'action composite du nerf auditif (PAC)

Le potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif était mesuré en réponse à une bouffée tonale (enveloppe trapézoïdale, durée=10 ms, temps de montée= temps de descente=1 ms, cadence=11 présentations par seconde, polarité alternée, 100 présentations). Les réponses cochléaires étaient amplifiées ($\times 20000$) et filtrées (32 - 35000 Hz) à l'aide d'un amplificateur différentiel de type Grass P511 (Astro-Med Inc., West Warwick, RI, USA). Les seuils audiométriques du PAC ont été évalués pour des bouffées tonales émises à 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 26 et 32 kHz. Le niveau de stimulation était progressivement augmenté par pas de 5 dB jusqu'à déterminer le plus petit niveau de stimulation générant une amplitude N_1 - P_1 supérieure à 2 μ V. De plus, à 2, 4, 8 et 16 kHz, l'amplitude N_1 - P_1 du PAC a été mesurée pour des niveaux de stimulation allant de 0 à 100 dB SPL par pas de 5 dB.

3.3.2.2. Activité soutenue du nerf auditif

L'activité soutenue du nerf auditif a été évaluée suivant l'approche décrite par Dolan et ses collaborateurs (Dolan et al., 1990). L'activité soutenue était évaluée pendant l'émission de bandes de bruit tiers d'octave (bruit blanc de loi de distribution uniforme centrée, traité par un filtre passe-bande Butterworth d'ordre 4). Les bandes de bruit tiers d'octave étaient émises en continu pendant 20 secondes, pour des fréquences centrales de stimulation allant

de 2 à 32 kHz, et des niveaux de stimulation progressant de 0 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. La densité spectrale de puissance (DSP) de l'activité cochléaire était ensuite évaluée avec une analyse de Fourier glissante par bloc (8000 échantillons/sec, 2000 échantillons par bloc, pondération de Hamming, moyennage sur 50 blocs consécutifs, résolution spectrale de 4 Hz). La densité spectrale de puissance était exprimée en $dB\mu V/\sqrt{Hz}$ (référence: 1 μV de tension efficace). La DSP spontanée du nerf auditif était évaluée en absence de stimulation sonore.

3.3.2.3. Peri-stimulus time response (PSTR)

La PSTR a été mesurée en réponse à une bande de bruit tiers d'octave pulsée. Les bandes de bruit étaient générées à partir d'un bruit blanc de loi de distribution uniforme centrée, traité par un filtre passe-bande Butterworth d'ordre 4. Chaque bande de bruit était modulée en amplitude par une enveloppe trapézoïdale (durée=300 msec, temps de montée= temps de descente= 2,5 ms, intervalle inter-stimulation=300 msec, 80 présentations, motif pseudo-aléatoire différent d'une présentation à l'autre). Les potentiels cochléaires enregistrés à la fenêtre ronde étaient traités en adaptant l'approche proposée par (Cazals and Huang, 1996). Pour isoler la réponse neurale, l'activité cochléaire était filtrée dans la bande fréquentielle 300-1200 Hz (filtre Butterworth d'ordre 3). La réponse neurale était ensuite redressée et lissée avec une fenêtre glissante d'1 ms, puis moyennée par synchronisation avec le début de la stimulation.

3.3.3. Activité unitaire des fibres auditives

Contrairement aux méthodes d'exploration fonctionnelle citées précédemment, l'enregistrement de l'activité unitaire des fibres auditives est une mesure très invasive classée sans réveil. Elle est donc réalisée en fin de protocole d'étude sur une partie des animaux de chaque groupe (contrôle et ouabaïne). Pour ces enregistrements, les stimulations acoustiques étaient délivrées par des écouteurs magnétiques (type MF1, Tucker-Davis) couplés à des barres d'oreille assurant une stimulation en champ clos.

3.3.3.1. Chirurgie et placement de l'électrode de recueil

Les tissus musculaires étaient détachés de l'arrière du crâne afin de dégager l'accès à l'os occipital. La suite de l'approche consistait à ouvrir l'os occipital, à récliner la dure-mère et à aspirer une partie du cervelet afin d'accéder au tronc cérébral et visualiser le nerf auditif à sa sortie du méat auditif. Les réponses unitaires des fibres du nerf auditif ont été enregistrées à l'aide de microélectrodes de verre préparées en faisant chauffer des tubes de verre (1 mm, WPI, ref 1B100F-4) avec une étireuse (Sutter P-1000) afin d'obtenir une électrode d'environ 0,06 μm de diamètre, avec une impédance de l'ordre de 80 - 100 M Ω . Cette microélectrode de verre était remplie d'une solution de NaCl à 3M, et reliée à un amplificateur (AxoClamp 2B, Axon Instrument). Une électrode de référence Ag/AgCl (E255 PHYMEP) était placée dans les muscles de la nuque de l'animal. La microélectrode de verre était descendue dans le nerf auditif à l'aide d'un micromanipulateur de façon enregistrer l'activité isolée (unitaire) des fibres du nerf auditif successivement détectées.

3.3.3.2. Caractérisation des fibres du nerf auditif

Un bruit large bande, émis à 70 dB SPL, était utilisé pour élever le taux de décharge de l'ensemble des fibres de façon non sélective. Ce bruit facilitait la détection des fibres pendant le déplacement de la microélectrode de verre dans le nerf auditif. Les potentiels d'action extracellulaires conduits par la fibre étaient ensuite détectés par application d'une procédure de seuillage contrôlée visuellement par l'expérimentateur (seuil généralement fixé à 0,5 mV au-dessus du potentiel de base). L'activité spontanée des fibres du nerf auditif était évaluée par moyennage du taux de décharge sur une durée de 30 secondes sans stimulation. Ensuite, une procédure de balayage en fréquence et en niveau permettait de déterminer la courbe d'accord de la fibre (champ récepteur de la fibre) en d'en déduire sa fréquence caractéristique (en kHz) et son seuil de réponse (en dB SPL).

3.3.3.3. Enregistrements simultanés

Pour évaluer la contribution d'une fibre à la réponse globale du nerf auditif, des enregistrements simultanés (Kiang et al., 1976, Wang, 1979, Prijs, 1986) ont été conduits avec, d'une part, une électrode boule implantée dans la niche de la fenêtre ronde, et d'autre part, une microélectrode de verre placée au contact d'une fibre auditive (**Figure 3.1**). Pour

s'assurer que les 2 voies d'acquisition étaient parfaitement bien synchronisées (absence de délai introduit par les filtres de mesure par exemple), nous avons mis au point un banc de test avec un générateur d'impulsions délivrant des pulses de tension (500 μ s, 100 mV) dans une solution saline. Deux électrodes connectées aux deux dispositifs d'enregistrement étaient alors placées dans la solution saline pour permettre d'enregistrer les pulses de tension et d'observer un éventuel retard entre les 2 voies d'acquisition induits par les filtres analogiques des amplificateurs de mesure. Cette expérience de contrôle a montré que le délai entre les 2 voies était négligeable (délai < 20 μ s). Ce dispositif calibré nous a permis de faire des enregistrements simultanés en réponse à des bouffées tonales (protocole CAP, section 3.3.2.1) ou à des bandes de bruit pulsées (protocole PSTR, section 3.3.2.3).

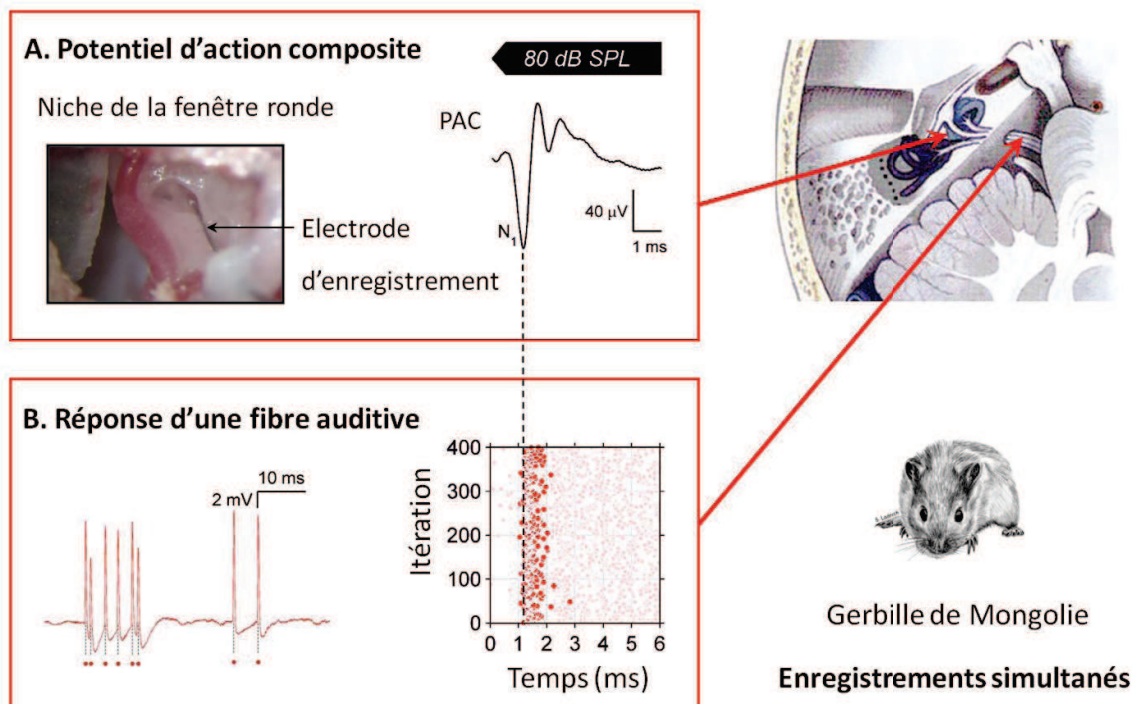


Figure 3.1: Enregistrement simultané de l'activité unitaire d'une fibre et du PAC. Dans cet exemple, les enregistrements simultanés sont effectués en réponse à une bouffée tonale correspondant à la fréquence de meilleure sensibilité de la fibre (FC=7127 Hz, enveloppe trapézoïdale, durée=10 ms, temps de montée=temps de descente= 1 ms, cadence= 11 présentations/s, polarité alternée, 400 présentations). **A.** Enregistrement du potentiel d'action composite à l'aide d'une électrode boule implantée dans la niche de la fenêtre ronde. Photo: à travers cette ouverture de la bulle tympanique on observe le cadre osseux du tympan (à gauche), l'artère stapédienne (rouge), et la niche de la fenêtre ronde dans laquelle sont situés l'électrode boule et la membrane de la fenêtre ronde (zone plus sombre). **B.** Etude de la réponse synchrone d'une fibre auditive. Pour chaque présentation de la stimulation, les instants d'occurrence des potentiels d'action de la fibre sont représentés par un point rouge. Pour chacune des 400 présentations de la stimulation, le premier potentiel d'action évoqué par la stimulation est identifié par un gros point rouge.

3.4. Investigation morphologique

Les animaux étaient décapités sous anesthésie profonde au pentobarbital sodique (50 mg/kg). Les cochlées étaient rapidement prélevées et fixées dans une solution à 4% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate salin (tampon phosphate 10 mM, pH 7,4; NaCl 0,9%). Les observations d'immunocytochimie ont été effectuées sur le plateau d'imagerie MRI de l'Institut des Neurosciences de Montpellier.

3.4.1. Immunohistochimie

Après fixation au paraformaldéhyde (30 minutes), les cochlées étaient rincées dans le tampon phosphate salin (PBS) et disséquées afin d'ôter la capsule otique, le ligament spiral, la strie vasculaire et la membrane tectoriale. Les tours étaient ensuite séparés selon un axe horizontal afin de donner des préparations de surface d'organe de Corti. Celles-ci étaient incubées toute la nuit à 4°C avec deux anticorps primaires monoclonaux de souris d'isotypes différents. Le premier anticorps était une IgG1 dirigée contre CtBP2 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA). Cet anticorps anti-CtBP2, dilué au 1/500^{ème}, reconnaît à la fois le co-répresseur de transcription CtBP2, situé dans le noyau des CCI, et le domaine B de RIBEYE, un composant des rubans présynaptiques. Le second anticorps était une IgG2a, dirigée contre la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA (clone 6C4, Millipore, Billerica, MA, USA). Il a été utilisé à une dilution au 1/200^{ème}. Après incubation avec les anticorps primaires (une nuit à 4°C sous légère agitation), les préparations d'organe de Corti étaient rincées dans le PBS, puis incubées 2 heures à température ambiante avec un couple d'anticorps secondaires fabriqués chez la chèvre (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et dirigés les uns contre les IgG1 de souris et les autres contre les IgG2a de souris. Les anticorps anti-IgG1 étaient conjugués au fluorochrome Alexa 488 et les IgG2a à l'Alexa 594. Ils ont été utilisés à une dilution au 1/1000^{ème}. Après trois rinçages dans le PBS, les préparations étaient montées sur une lame de microscope en verre avec un milieu de montage fluorescent (Dako North America, Inc, USA).

3.4.2. Imagerie confocale

L'acquisition des images a été effectuée à l'aide d'un microscope laser confocal (Microscope inverse 1 Zeiss AxioObserver / LSM 5 LIVE DUO), de l'apex à la base de la

cochlée. Le nombre de synapses par CCI n'étant pas constant le long de la cochlée (Meyer et al., 2009), douze à quatorze points de mesure équidistants (saut régulier de 70 CCI soit ~700 μm d'après (Tarnowski et al., 1991)) ont été considérés tout le long de la rangée des CCI en partant de l'apex. Réalisée à haute résolution (x63, zoom 2), chaque prise d'image regroupait en moyenne 7 CCI. Le pôle baso-latéral de ces CCI était entièrement numérisé par pas de 0,4 μm en z, du faisceau spiral interne au-dessous des CCI, jusqu'au-dessus du ruban synaptique le plus apical dans la région supranucléaire de la cellule. Les séquences d'images ainsi obtenues (16 à 30 plans focaux par point de mesure) étaient ensuite importées dans le logiciel de traitement ImageJ (Wayne S Rasband, <http://imagej.nih.gov/ij/>) afin d'extraire les images par plan et par canal.

3.4.3. Reconstruction 3D

Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Matlab et de sa toolbox "image processing". Pour commencer une projection 2D était effectuée par superposition de tous les plans optiques obtenus en z (**Figure 3.2A**). Cette projection nous permettait de sélectionner la zone d'étude en rejetant les CCI situées sur les bords de l'image (pour lesquelles une partie des synapses risquait d'être hors-champ).

Au sein de la zone étudiée (6 - 7 CCI au centre de la prise d'image), les structures anatomiques recherchées apparaissaient dans les images confocales sous la forme d'amas de voxels adjacents d'intensité forte. Pour détecter ces amas, nous avons développé un algorithme de classification ascendant hiérarchique qui agrège, de proche en proche, les voxels en contact latéral. Cet algorithme commence tout d'abord par agréger les voxels voisins (voxels qui partagent une face) ; dès que l'algorithme commence à agréger des voxels distants (voxels qui ne partagent par une face), le programme informatique considère que l'amas de voxels est circonscrit et clos. Appliqué séparément sur le canal vert et sur le canal rouge, cet algorithme permet donc de détecter indépendamment les noyaux cellulaires, les rubans synaptiques et les densités de récepteurs (**Figure 3.2B**). Dans cette étude, les seuils en intensité ont été déterminés qualitativement par l'expérimentateur sur le canal rouge et le canal vert pour retenir les voxels les plus intenses. Le choix des seuils était guidé par l'histogramme des intensités. Pour détecter la juxtaposition d'un ruban synaptique et d'une densité de récepteurs, nous avons utilisé la propriété de diffusion des marqueurs synaptiques qui tend à marquer la structure cible bien au-delà de ses limites anatomiques.

En combinant les canaux vert et rouge, la juxtaposition apparaît donc en jaune (**Figure 3.2C**). La détection du nombre de synapses dites « complètes » peut ensuite se faire avec l'algorithme de classification hiérarchique ascendant appliqué au canal mixte jaune. Menée pour chaque point de mesure, cette procédure permet d'évaluer le nombre de synapses à ruban par CCI.

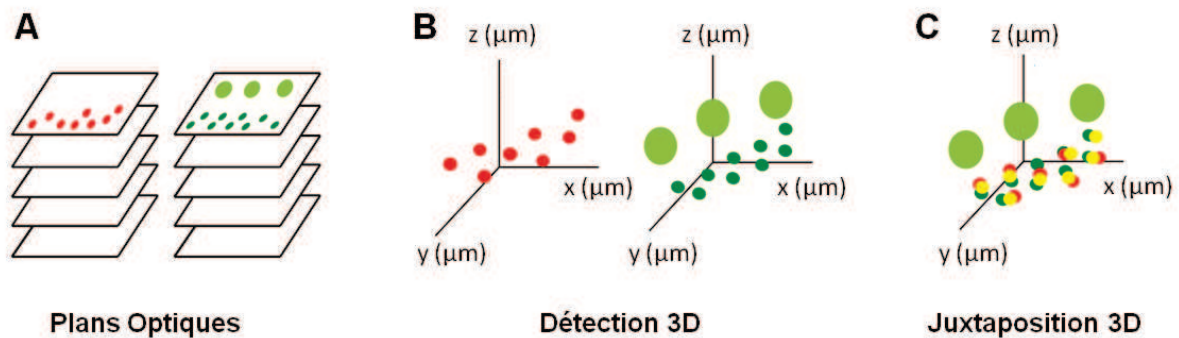


Figure 3.2 : Méthode de détection illustrée sur des données simulées. **A.** Les canaux rouge et vert des plans optiques sont analysés par l'algorithme de détection 3D. Dans le canal vert, les noyaux des CCI sont marqués en vert pâle alors que les rubans synaptiques sont marqués en vert vif. **B.** L'algorithme de détection appliqué séparément sur le canal rouge et le canal vert permet de circonscrire les contours des densités de récepteurs, des noyaux cellulaires et des rubans synaptiques. Dans cet exemple on distingue: 8 densités de récepteurs en rouge, 3 noyaux cellulaires en vert pâle et 9 rubans synaptiques en vert vif. **C.** Après fusion des canaux rouge et vert, l'algorithme détecte 8 synapses complètes (en jaune).

3.5. Analyse des données

Toutes les données ont été analysées à l'aide du logiciel Matlab (MathWorks company) et de ses boîtes à outils *Statistics* et *Curve Fitting toolboxes*.

3.5.1. Modèle d'ajustement des PSTH et PSTR

Les différentes composantes des réponses temporelles (PSTH et PSTR) ont été analysées en utilisant le modèle d'ajustement proposé par (Westerman and Smith, 1984) pour l'étude de réponses unitaires chez la gerbille. Ce modèle correspond à la somme de deux composantes exponentielles transitoires et d'une composante continue, soit une équation à 5 paramètres:

$$A(t) = \begin{cases} A_R e^{-\frac{t}{\tau_R}} + A_{ST} e^{-\frac{t}{\tau_{ST}}} + A_{SS} & \text{si } 0 \leq t \leq t_{off} \\ 0 & \text{sinon} \end{cases}$$

Dans ce modèle, A_R (exprimée en μV pour la PSTR et PA/s pour le PSTH) et τ_R (exprimée en ms) représentent l'amplitude et la constante de temps de la composante rapide, A_{ST} (exprimée en μV pour la PSTR et PA/s pour le PSTH) et τ_{ST} (exprimée en ms) représentent l'amplitude et la constante de temps de la composante lente, et A_{SS} (exprimée en μV pour la PSTR et PA/s pour le PSTH) représente l'amplitude de la composante continue. La réponse est maximale à l'instant $t=0$ ms et se termine à l'instant t_{off} exprimé en ms. Les deux composantes exponentielles se différencient par l'ordre de grandeur de leurs constantes de temps. L'adéquation entre le modèle de d'ajustement et la réponse étudiée (PSTH ou PSTR) est traduite par le coefficient de détermination R^2 . D'une valeur comprise entre 0 et 1, il peut être exprimé en pourcentage et interprété comme la part de variance de la réponse expliquée par le modèle. Autrement dit, plus il se rapproche de 1, plus la qualité de l'ajustement est bonne.

3.5.2. Analyse statistique

Les moyennes sont exprimées \pm une fois l'erreur standard (ou \pm une fois l'écart type si mentionné). Lorsque les conditions d'application des tests paramétriques étaient respectées (distribution normale des échantillons), la comparaison de deux groupes était effectuée à l'aide d'un test de Student, et la comparaison de plusieurs groupes était effectuée à l'aide d'un test d'analyse de variance (ANOVA à 1 facteur), complété par un test de comparaison multiple. Sinon, des tests non-paramétriques étaient réalisés: la comparaison de deux groupes était effectuée à l'aide d'un test de Wilcoxon et plusieurs groupes étaient comparés à l'aide d'un test de Kruskal-Wallis, complété par un test de comparaison multiple.

4. RESULTATS

Ce travail de thèse avait pour but de développer une nouvelle méthode d'exploration fonctionnelle rendant mieux compte de l'intégrité du complexe CCI - fibres afférentes. Il répond à une demande clinique de plus en plus pressante pour le diagnostic des neuropathies auditives (Starr et al., 1996, Zeng et al., 2005) dont le nombre est très certainement sous-estimé. En effet, une série d'études menées chez l'animal a montré que les seuils auditifs peuvent être absolument normaux malgré d'importantes pertes de fibres (désafférentation) induites par une surexposition sonore modérée (Kujawa and Liberman, 2009, Lin et al., 2011, Furman et al., 2013), ou par le vieillissement (Sergeyenko et al., 2013). De plus, l'amplitude et la latence de la réponse synchrone du nerf auditif (onde I des potentiels évoqués auditifs précoces) peuvent être normales malgré la perte de 20% de fibres dans le nerf auditif (Bourien et al., 2014). Le travail présenté ici a été exclusivement mené chez l'animal mais pourrait poursuivre son développement en clinique dans le but de mieux caractériser les atteintes synaptiques et neurales (Zeng et al., 2005, Moser et al., 2013).

Les résultats présentés dans cette étude s'appuient sur des comptages de synapses et des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* (potentiels cochléaires globaux et activité unitaire de fibres). Ils sont présentés en quatre parties. Dans la première partie (4.1), nous avons présenté le modèle expérimental de neuropathie utilisé pour évaluer notre méthode. Dans la seconde partie (4.2), nous avons étudié la méthode de référence, à savoir l'évaluation de la réponse synchrone des fibres auditives, à travers l'enregistrement du potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif. Le manque de sensibilité du PAC nous a conduit à développer une nouvelle approche (4.3) basée sur la réponse soutenue des fibres. Dans une quatrième partie (4.4), nous avons proposé une méthode qui rend compte à la fois des réponses synchrone et soutenue du nerf auditif. Cette dernière approche donne accès aux constantes de temps d'adaptation des fibres, une information qui n'est à l'heure actuelle accessible qu'au moyen d'enregistrements unitaires.

4.1. Modèle expérimental de neuropathie

Pour commencer cette étude, nous avons eu besoin de créer un modèle de neuropathie caractérisé par une perte partielle de fibres du nerf auditif (~25%). Il était important que le degré de perte ne soit pas trop sévère pour se situer dans des conditions physiopathologiques réalistes (Kujawa and Liberman, 2009, Sergeyenko et al., 2013). Chez la gerbille, l'application d'une solution d'ouabaïne dans la niche de la fenêtre ronde induit une perte sélective de fibres du nerf auditif suivant un effet dose dépendant (Schmiedt et al., 2002, Lang et al., 2005, Bourien et al., 2014). En bloquant les pompes sodium-potassium, qui jouent un rôle essentiel dans le maintien du potentiel de repos des neurones, l'ouabaïne induit la mort cellulaire des fibres auditives sans affecter l'activité des cellules ciliées. En s'appuyant sur des travaux antérieurs menés dans l'équipe (Tang, 2011, Bourien et al., 2014), une concentration de 33 μ M a été retenue pour cette étude. En pratique, une solution de périlymphe artificielle contenant 33 μ M d'ouabaïne était appliquée pendant 30 minutes dans la niche de la fenêtre ronde de la cochlée. Après une semaine de repos, l'activité cochléaire était évaluée au moyen de l'enregistrement des produits de distorsion acoustiques et des potentiels cochléaires globaux. Les animaux étaient ensuite divisés en 2 groupes afin de réaliser des enregistrements unitaires chez un premier groupe et des comptages de synapses par immuno-marquage chez un second groupe. Un groupe d'animaux contrôles a été exploré suivant le même protocole expérimental.

4.1.1. Nombre de synapses à ruban par cellule ciliée interne

La perte de fibres induite par l'ouabaïne a été évaluée en comptant le nombre de synapses par cellule ciliée interne (CCI) pour des cochlées contrôles ($n = 4$) et des cochlées exposées à 33 μ M d'ouabaïne ($n = 4$). Pour chaque cochlée, une douzaine de points de mesure ont été considérés, répartis de l'apex à la base, toutes les 70 CCI, avec en moyenne 7 CCI adjacentes par point de mesure. Pour marquer les synapses à ruban de la CCI, nous avons utilisé un anticorps anti-CtBP2 qui reconnaît à la fois le co-répresseur de transcription CtBP2, situé dans le noyau des CCI, et le domaine B de RIBEYE, un composant des rubans présynaptiques. Le second anticorps utilisé était dirigé vers la sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA pour visualiser la densité postsynaptique. Les synapses ont été comptées comme potentiellement fonctionnelles lorsque les immunoréactivités de RIBEYE et de GluA2 étaient juxtaposées sur des images acquises par microscopie confocale 3D (**Figure 4.1**). La

position fréquentielle correspondant à la prise d'image était calculée d'après la carte fréquentielle de la gerbille établie par (Muller, 1996).

La **Figure 4.1A** présente une projection de tous les plans optiques obtenus en z dans la zone codant la fréquence 16 kHz pour une cochlée contrôle. Les grands halos vert pâle situés en haut de l'image représentent les noyaux (*n*) des 6 CCI, tandis que les marquages punctiformes en bas de l'image correspondent à la juxtaposition d'éléments pré- (vert) et postsynaptiques (rouge). Le carré blanc représenté sur cette projection indique la surface de 6 μm^2 étudiée dans les 3 petites images de la **Figure 4.1B**. Ces 3 petites images présentent séparément puis conjointement le marquage des éléments pré- et postsynaptiques avec, à gauche, la détection des marquages immunoréactifs de RIBEYE (CtBP2), au centre, la détection des marquages immunoréactifs de GluA2, et à droite, la superposition de ces immunoréactivités. Afin de différencier d'éventuelles synapses superposées en z, des analyses tridimensionnelles (3D) ont été systématiquement réalisées à l'aide du logiciel Matlab et de sa toolbox « image processing ». La **Figure 4.1C** présente deux reconstructions 3D suivant deux azimuts différents. Dans cet exemple, 100% des éléments pré- et postsynaptiques sont juxtaposés.

Des cochlées exposées à 33 μM d'ouabaïne ont ensuite été analysées suivant la même technique. Alors qu'à première vue la projection des images confocales (faible grossissement) laisse penser que l'ouabaïne n'a pas eu d'effet sur le nombre de synapses par CCI (**Figure 4.1D**), l'analyse 3D réalisée à fort grossissement (**Figures 4.1E,F**) montre que certains rubans synaptiques (~20%) ne sont pas juxtaposés à une densité postsynaptique. Pour vérifier cette observation, nous avons répliqué cette analyse sur 4 cochlées contrôles et 4 cochlées exposées à 33 μM d'ouabaïne, dans la zone du 16 kHz (**Figure 4.1G**). Chez les cochlées exposées, le nombre d'éléments postsynaptiques diminue significativement (contrôle : $21,1 \pm 1,2$; ouabaïne : $15,9 \pm 0,6$ éléments/CCI, $p < 0,05$) tandis que le nombre de rubans reste similaire à celui des cochlées contrôles (contrôle : $20,4 \pm 1,3$; ouabaïne : $19,5 \pm 0,6$ éléments/CCI, $p > 0,1$). Cette plus grande vulnérabilité de la post-synapse à l'ouabaïne était prévisible puisque les pompes Na^+/K^+ -ATPase (cibles de l'ouabaïne) sont massivement exprimées sur la terminaison périphérique des fibres du nerf auditif (McLean et al., 2009).

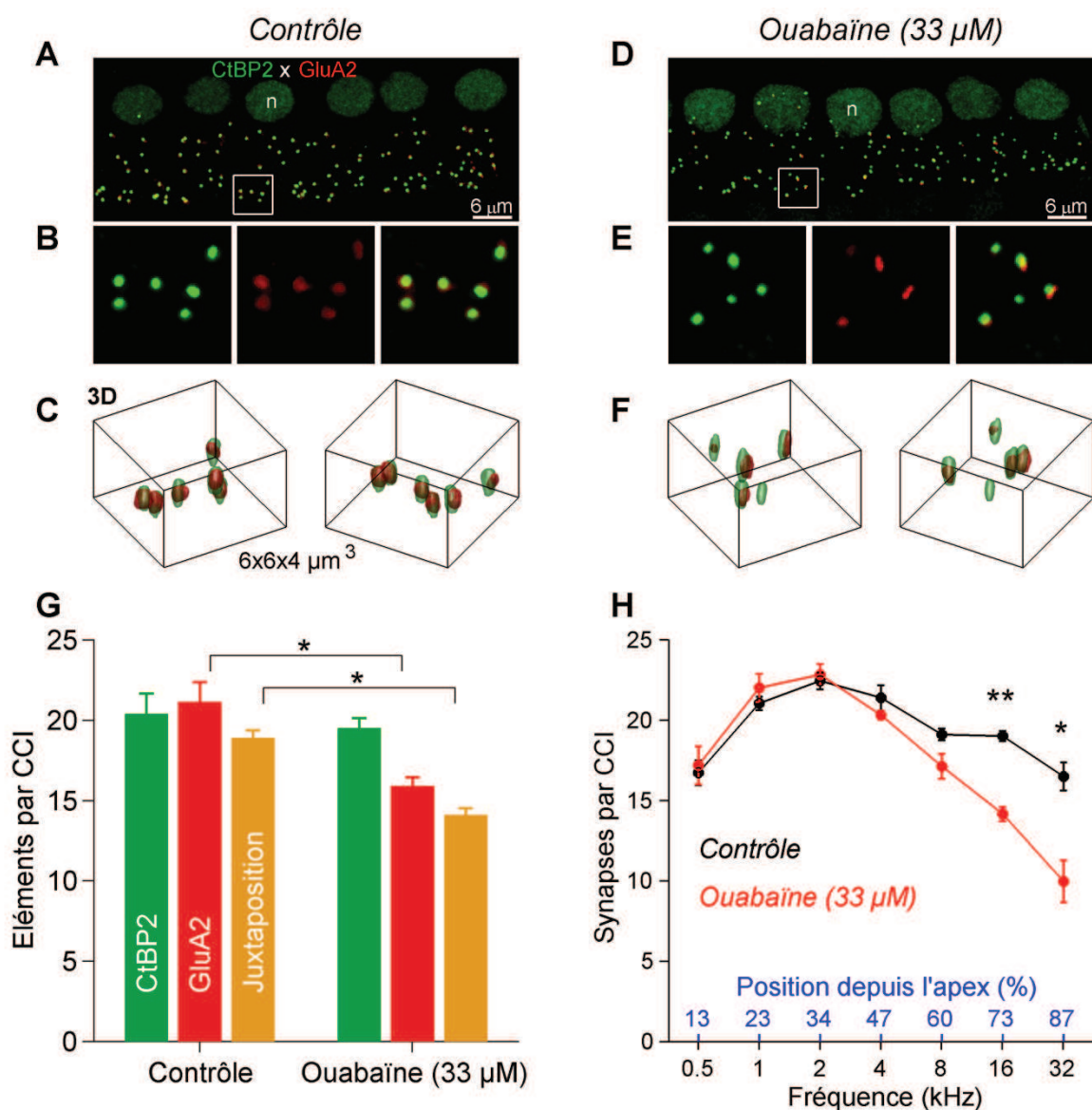


Figure 4.1: Perte de synapses après application de 33 µM d'ouabaïne. A-F: Images acquises en microscopie confocale dans la région codant pour le 16 kHz (Cf. carte fréquentielle de la gerbille (Muller, 1996)) pour une cochlée contrôle (A-C) et pour une cochlée exposée à 33 µM d'ouabaïne (D-F). Les rubans synaptiques (éléments présynaptiques) et les noyaux des cellules ciliées internes sont marqués avec un anticorps anti-CtBP2. Les récepteurs AMPA (éléments postsynaptiques) sont marqués avec un anticorps anti-GluA2. Les éléments pré- et postsynaptiques sont juxtaposés à l'aide d'une analyse tridimensionnelle. Pour la cochlée contrôle, 100% des éléments pré- et postsynaptiques sont juxtaposés, contre 80% pour la cochlée exposée à l'ouabaïne. G. Quantification des éléments détectés par cellule ciliée interne (CCI) dans la zone du 16 kHz chez des cochlées contrôles ($n=4$ cochlées, 27 CCI) et chez des cochlées exposées à 33 µM d'ouabaïne ($n=4$ gerbilles, 26 CCI). Cette analyse détaille la quantification des éléments présynaptiques (CtBP2), des éléments postsynaptiques (GluA2) et des éléments pré- et postsynaptiques juxtaposés. H. Nombre de synapses par CCI estimé pour chaque bande d'octave comprise entre 0,5 et 32 kHz. Ces données correspondent aux éléments pré- et postsynaptiques juxtaposés pour 4 cochlées contrôles (noir) et pour 4 cochlées exposées à l'ouabaïne (rouge). Tests Statistiques : * $p<0,05$; ** $p<0,01$ Wilcoxon rank sum test.

Pour aller plus loin, nous avons répliqué cette analyse le long de l'axe tonotopique en partant de la zone fréquentielle codant pour le 500 Hz (soit 13% de l'apex), jusqu'à la zone codant pour le 32 kHz (soit 87% de l'apex). Dans la **Figure 4.1H**, les comptages obtenus chez les cochlées contrôles sont représentés en noir, tandis que les comptages obtenus chez les cochlées exposées sont représentés en rouge. Aucune différence significative n'est observée entre ces deux groupes au-dessous de 8 kHz. Par contre, au-dessus de 8 kHz, une diminution significative du nombre de synapses par CCI (de l'ordre de 25% dans la zone du 16 kHz) a été observée chez les cochlées exposées à l'ouabaïne.

Ces résultats suggèrent que l'application d'une faible dose d'ouabaïne induit une déafférentation des cellules ciliées internes dans la partie basale de la cochlée, au travers d'une action préférentiellement post-synaptique de la drogue.

4.1.2. Propriétés fonctionnelles des fibres auditives

Pour étudier les caractéristiques fonctionnelles des fibres non affectées par l'application de ouabaïne, nous avons réalisé des enregistrements unitaires chez 4 gerbilles traitées (424 fibres) et 10 gerbilles contrôles (637 fibres). Chaque fibre a été caractérisée par son activité spontanée (AS), sa fréquence caractéristique (FC) et son seuil de réponse (S). Nous avons ensuite représenté le seuil de réponse des fibres en fonction de leur fréquence caractéristique pour le groupe contrôle (**Figures 4.2A**) et le groupe ouabaïne (**Figure 4.2B**). Alors que la proportion et la distribution des fibres à haute- (points rouges) et moyenne-AS (points bleus) semblent similaires chez ces deux groupes, les fibres à basse-AS (points verts), majoritairement distribuées dans la partie basale de la cochlée ($FC > 4$ kHz) chez le groupe contrôle, ont quasi disparu au sein du groupe ouabaïne. Pour mettre en évidence cette observation, nous avons représenté l'activité spontanée des fibres en fonction de leur fréquence caractéristique (**Figures 4.2C,D**). Tandis que chez le groupe contrôle, les fibres à basse-AS représentent 17% de la population (soit 108 fibres sur 637), elles ne représentent plus que 1,5% de la population (soit 7 fibres sur 424) au sein du groupe ouabaïne. Pour aller plus loin dans l'analyse de ces données, nous avons construit les histogrammes de l'activité spontanée de ces fibres (**Figures 4.3A,D**). La forte représentation des fibres à basse-AS chez le groupe contrôle est mise en évidence par l'amplitude de la première barre de l'histogramme (224 fibres pour $AS < 5$ PA/s).

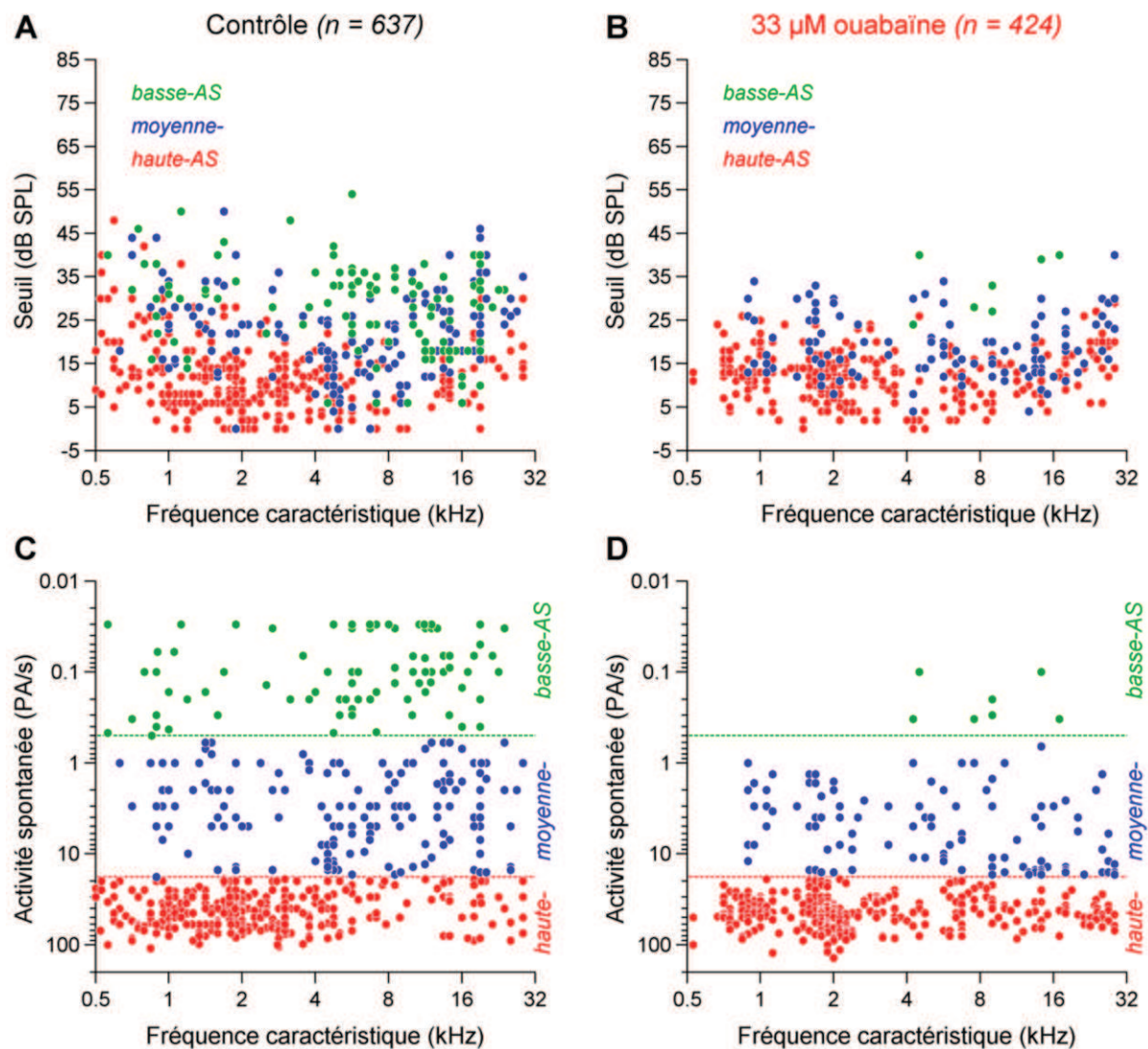


Figure 4.2: Caractéristiques des fibres du nerf auditif de gerbilles contrôles (A, C) et traitées à l'ouabaine (B, D). A, C. Seuil de réponse des fibres en fonction de leur fréquence caractéristique chez les gerbilles contrôles (A, *contrôle*, 637 fibres, 10 gerbilles) et les gerbilles exposées à l'ouabaine (B, 33 μ M *ouabaine*, 424 fibres, 4 gerbilles). Chaque fibre est représentée par un point dont la couleur indique la classe de la fibre : Les fibres à basse-AS (AS < 0,5 PA/s) sont représentées en vert, les fibres à moyenne-AS (0,5 \leq AS \leq 18 PA/s) en bleu, et les fibres à haute-AS (AS > 18 PA/s) en rouge. B, D. Activité spontanée des fibres en fonction de leur fréquence caractéristique chez les gerbilles contrôles (B, mêmes fibres qu'en A) et les gerbilles exposées à l'ouabaine (D, mêmes fibres qu'en B). Les lignes pointillées horizontales démarquent les fibres à haute (> 18 PA/s; rouge), moyenne (0,5-18 PA/s; bleu) et basse (< 0,5 PA/s; vert) activité spontanée. Pour faciliter la représentation des fibres ayant une AS égale à 0 PA/s sur cette échelle logarithmique, celles-ci sont représentées à un niveau d'AS égal à 0,033 PA/s (second plus petit niveau d'AS mesurable au cours des 30 secondes d'enregistrement de l'AS).

Chez le groupe ouabaïne, l'amplitude de cette première barre chute fortement (59 fibres pour $AS < 5$ PA/s) tandis que les fibres à haute-AS sont pratiquement aussi nombreuses que dans le groupe contrôle. En étudiant séparément les fibres distribuées dans la partie apicale ($FC < 4$ kHz) de la cochlée, on constate que la représentation des fibres à basse-AS passe de 8% chez le groupe contrôle (**Figure 4.3B**) à 0% chez le groupe ouabaïne (**Figure 4.3E**). La perte des fibres à basse-AS est cependant moins impressionnante dans la partie apicale de la cochlée que dans la partie basale ($FC > 4$ kHz), où les fibres à basse-AS sont majoritairement distribuées. Au sein des fibres codant ces hautes fréquences, la représentation des fibres à basse-AS passe de 29% chez le groupe contrôle (**Figure 4.3C**) à 4% chez le groupe ouabaïne (**Figure 4.3F**).

Nous avons ensuite calculé les distributions cumulées des fibres en fonction de leur activité spontanée, leur seuil de réponse et leur fréquence caractéristique. Les courbes obtenues pour le groupe contrôle (noir) et pour le groupe ouabaïne (rouge) sont superposées dans les Figures 4.3G-I.

La **Figure 4.3G** représente les distributions cumulées des fibres en allant des basses aux hautes activités spontanées. La faible représentation des fibres à basse AS chez les animaux traités retarde la progression de la distribution cumulée. Comme nous l'avons observé précédemment sur les Figures 4.3A et 4.3D, seul 1% des fibres exposées à l'ouabaïne ont une basse-AS (distribution cumulée atteinte pour un niveau d'AS égal à 0,5 PA/s) tandis que ce pourcentage s'élève à 17% pour les fibres contrôles. Jusqu'à un niveau d'AS égal à 18 PA/s, ce retard de progression est conservé car le pourcentage de fibres à moyenne-AS est similaire dans les deux populations (29%, Figures 4.3A et 4.3D). La différence significative ($p < 0,001$) obtenue entre les groupes contrôle et ouabaïne est donc liée à la faible représentation des fibres à basse-AS dans le groupe ouabaïne. La **Figure 4.3H** représente les distributions cumulées des fibres en allant des bas vers les hauts seuils d'activation. En accord avec la disparition des fibres à basse-AS, ce sont les fibres à haut seuil d'activation (seuil > 15 dB SPL) qui dégénèrent préférentiellement après application d'ouabaïne. Par exemple, alors que pour le groupe contrôle 37% des fibres ont un seuil supérieur à 20 dB SPL, seuls 16% ont un seuil supérieur à 20 dB SPL pour le groupe ouabaïne, soit un écart de 21 points de pourcentage (ligne pointillée). Pour finir, nous avons représenté les distributions cumulées des fibres en évoluant des basses aux hautes fréquences caractéristiques (**Figure 4.3I**). Cette fois, il n'y a pas de différence significative entre les groupes contrôle et ouabaïne.

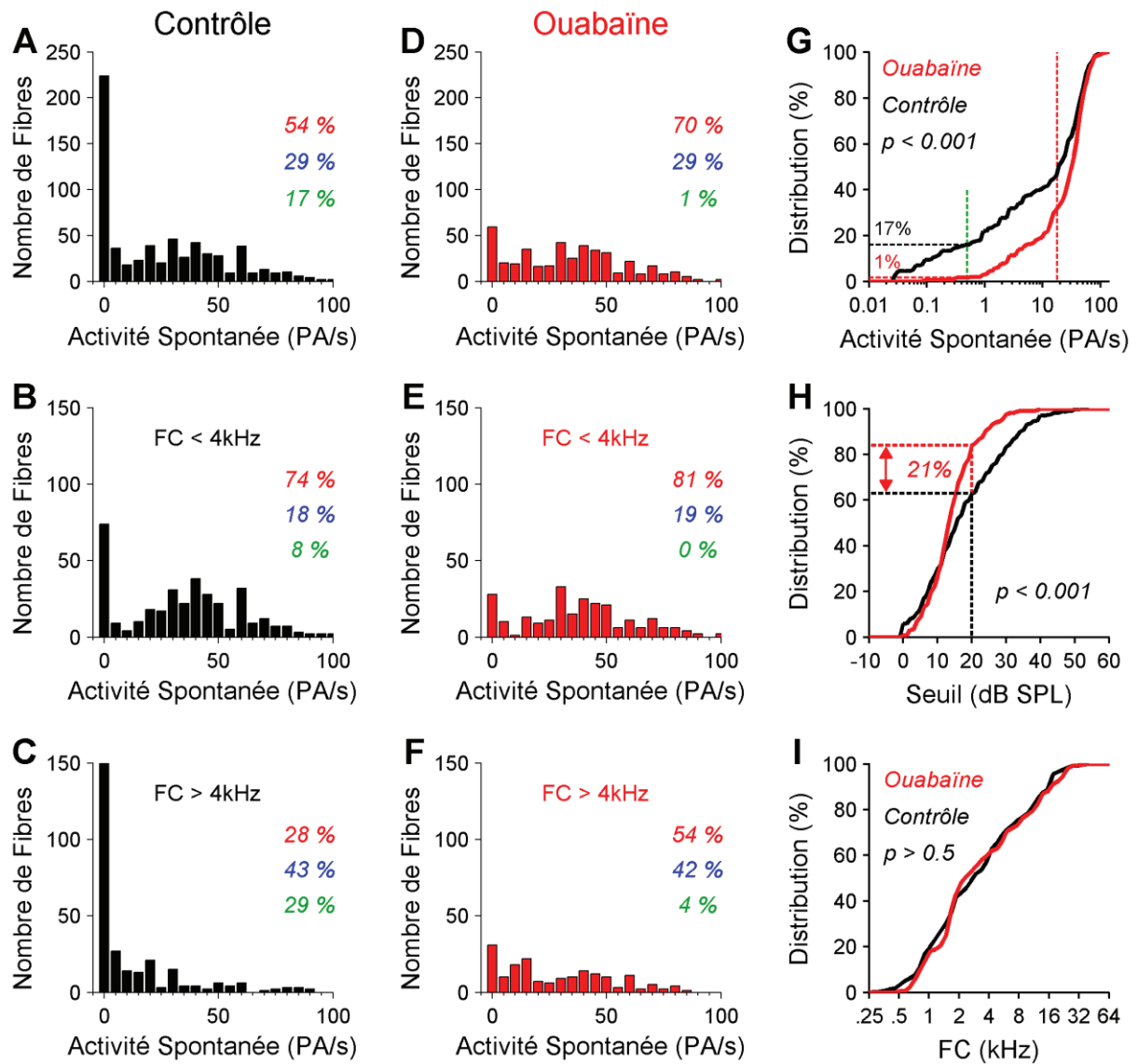


Figure 4.3: Analyse statistique des caractéristiques des fibres contrôles (A, C) et traitées à l'ouabaïne (B, D). A-C. Distribution de l'activité spontanée des fibres enregistrées chez 10 gerbilles contrôles, pour l'ensemble des fibres enregistrées (A, 637 fibres), pour les fibres présentant une fréquence caractéristique (FC) inférieure ou égale à 4 kHz (B, 357 fibres) et pour les fibres présentant une fréquence caractéristique supérieure à 4 kHz (C, 280 fibres). D-F. Distribution de l'activité spontanée des fibres enregistrées chez 4 gerbilles exposées à 33 μ M d'ouabaïne, pour l'ensemble des fibres enregistrées (D, 424 fibres), pour les fibres présentant une FC \leq 4 kHz (E, 247 fibres) et pour les fibres présentant une FC > 4 kHz (F, 177 fibres). G-I. Distributions cumulées des fibres en fonction: de leur activité spontanée (G), de leur seuil de réponse (H), et de leur fréquence caractéristique (I) pour les fibres enregistrées chez les gerbilles contrôles (tracés noirs, 637 fibres) et exposées à l'ouabaïne (tracés rouges, 424 fibres). Ces distributions cumulées sont construites avec un pas de distribution logarithmique (20 intervalles par décade). Une différence significative entre les groupes contrôle et ouabaïne (test de Kolmogorov-Smirnov pour deux échantillons) est mise en évidence pour les distributions cumulées présentées dans les figures G ($p < 0,001$) et H ($p < 0,001$) alors qu'il n'y a pas de différence significative pour les distributions cumulées présentées dans la figure I ($p > 0,5$).

Ce dernier résultat suggère que l'effet de l'ouabaïne ne dépend pas de la fréquence caractéristique des fibres, comme les résultats de comptages des synapses le laissaient imaginer. La perte de fibres dans la partie basale de la cochlée est avant tout liée à un effet spécifique de l'ouabaïne sur les fibres à basse-AS, majoritairement représentées dans cette partie de la cochlée. Ce résultat, en contraste avec les données observées chez le rat (Fu et al., 2012) est développé dans la discussion.

L'ensemble de ces résultats montre que le modèle de neuropathie obtenu chez la gerbille, par application d'une solution de 33 μM d'ouabaïne dans la niche de la fenêtre ronde, détruit préférentiellement les fibres à basse-AS.

4.2. Activité synchrone des fibres du nerf auditif

Les mesures objectives utilisées en clinique pour évaluer l'activité du nerf auditif (ondes précoces des potentiels évoqués auditifs et/ou potentiel d'action composite du nerf auditif) sont basées sur l'étude de l'activité synchrone des fibres du nerf auditif. Recueillies en champ lointain, ces réponses sont amplifiées, filtrées et moyennées de façon à extraire une première onde reflétant la synchronisation des réponses unitaires en début de stimulation. Pour comprendre dans quelle mesure l'amplitude de cette réponse globale permet de détecter la perte de fibres auditives, nous avons étudié les réponses obtenues dans le modèle de neuropathie décrit précédemment.

4.2.1. Réponse synchrone dans le modèle de neuropathie

Pour déterminer si la perte de fibres induite par l'ouabaïne peut être détectée à partir de la réponse synchrone du nerf auditif, nous avons mesuré et comparé les potentiels d'action composites (PAC) du nerf auditif enregistrés chez des gerbilles contrôles ($n = 7$) et des gerbilles exposées à 33 μM d'ouabaïne ($n = 7$).

Préalablement, pour s'assurer que l'ouabaïne n'avait pas eu une action délétère sur l'activité des cellules ciliées externes, nous avons vérifié que les produits de distorsion acoustiques de ces 2 groupes étaient parfaitement superposables (**Figure 4.4A**).

Le seuil d'apparition du PAC a ensuite été mesuré pour les fréquences de stimulation supérieures à 2 kHz (**Figure 4.4B**). L'absence de modification des seuils auditifs chez les

gerbilles exposées à l'ouabaine s'explique par l'atteinte spécifique des fibres à basse-AS, caractérisées par un haut seuil d'activation (Liberman, 1978). L'amplitude N_1 - P_1 du PAC a été enregistrée à 2, 4, 8 et 16 kHz, pour des niveaux de stimulation allant jusqu'à 100 dB SPL par pas de 5 dB (**Figures 4.4C-F**). Quelle que soit la fréquence testée, les amplitudes relevées chez les gerbilles exposées à l'ouabaine (rouge) sont similaires à celles obtenues chez les gerbilles normoentendantes (noir). Ce résultat surprenant suggère que la disparition des fibres à basse-AS n'affecte pas l'amplitude du PAC, et ce même aux plus hauts niveaux de stimulation. Ainsi, bien que les fibres à basse-AS du groupe contrôle soient recrutées par ces hauts niveaux de stimulation, leur activité évoquée ne semble pas participer à l'amplitude du PAC.

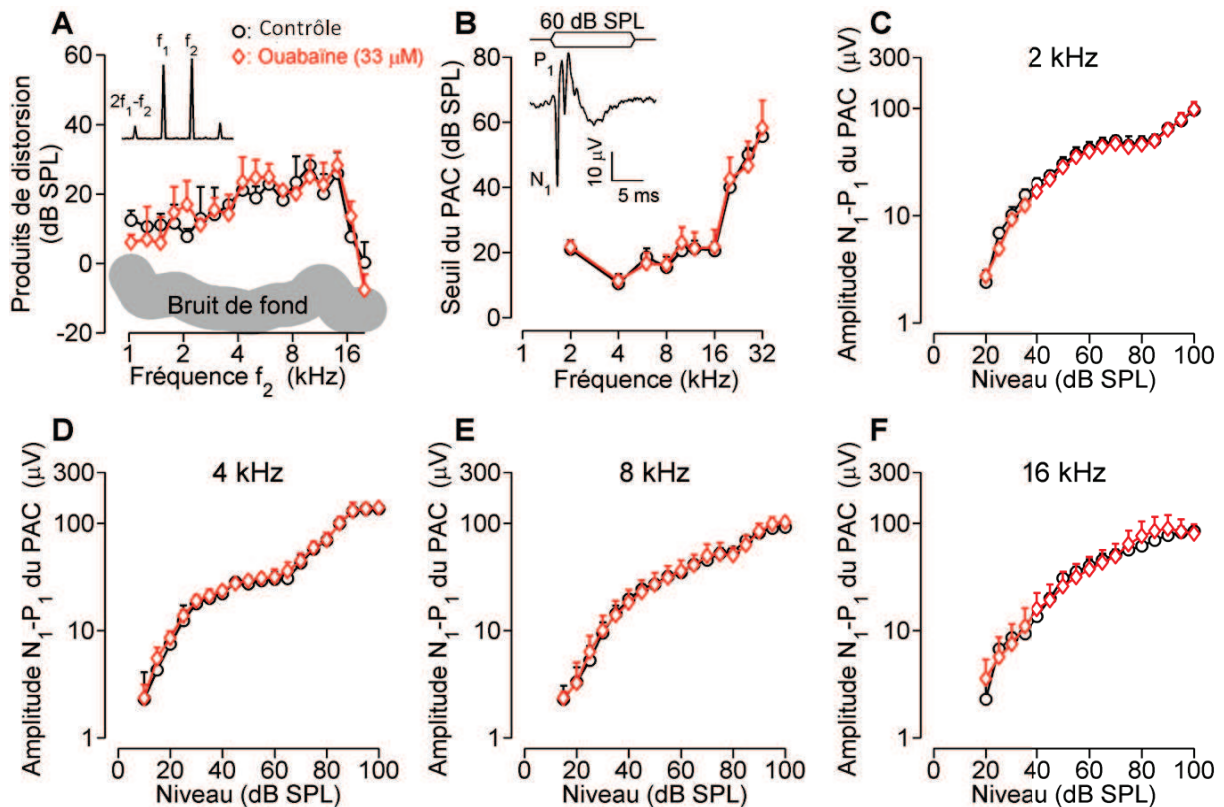


Figure 4.4: Exploration fonctionnelle (produits de distorsion acoustiques et PAC) chez des animaux contrôle (noir, $n = 7$) et exposés à de l'ouabaine (rouge, $n = 7$). **A.** Produits de distorsion acoustiques entre 1 et 20 kHz reflétant l'activité des cellules ciliées externes. **B.** Seuils auditifs relevés de 2 à 32 kHz à partir des potentiels d'action composites (PAC). **C-F.** Amplitude N_1 - P_1 du PAC enregistré à 2, 4, 8, et 16 kHz en réponse à une bouffée tonale (1 ms de front de montée et de descente, 10 ms de durée, 11 bouffées/s) présentée par pas de 5 dB jusqu'à 100 dB SPL.

Ces résultats montrent que l'amplitude du PAC ne permet pas de détecter la perte de fibres à basse-AS. Autrement dit, l'activité évoquée des fibres à basse-AS est mal représentée par l'amplitude du PAC.

4.2.2. Contribution unitaire à la réponse synchrone

Pour comprendre pourquoi la disparition des fibres à basse-AS est indétectable à l'aide du PAC, nous avons enregistré simultanément le PAC et l'activité d'une fibre (Wang, 1979, Versnel et al., 1990). Pour ce faire, une électrode boule de platine était implantée dans la niche de la fenêtre ronde afin d'enregistrer le PAC et une microélectrode de verre était introduite dans le nerf auditif, à sa sortie du conduit auditif interne, afin d'enregistrer l'activité unitaire des fibres. Chaque fibre contactée était tout d'abord caractérisée fonctionnellement par son activité spontanée (AS), son seuil d'activation (S) et sa fréquence caractéristique (FC). Son activité unitaire et le PAC étaient ensuite enregistrés simultanément en réponse à une bouffée tonale présentée à la fréquence caractéristique de la fibre. Le stimulus était présenté à 500 reprises afin de moyenner les réponses obtenues.

La **Figure 4.5A** montre le PAC enregistré en réponse à une bouffée tonale présentée à 7127 Hz et 50 dB SPL. Cette réponse globale est composée d'une onde polyphasique d'amplitude pic à pic égale à 80,6 μ V en début de stimulation (réponse *on*) puis d'une onde polyphasique d'amplitude pic à pic égale à 6 μ V après l'arrêt de la stimulation (réponse *off*). L'amplitude N_1 - P_1 séparant les deux premières ondes de la réponse *on* reflète la forte synchronisation des premiers potentiels d'action évoqués dans les fibres recrutées par la stimulation.

La **Figure 4.5B** présente l'activité de la fibre (FC=7127 Hz, AS=50 PA/s, S=8 dB SPL) en réponse à une bouffée tonale. La fibre a généré une série de 5 potentiels d'action (PA) caractérisés dans le tracé par 5 signaux transitoires (d'amplitude \sim 2 mV). Dans les **Figures 4.5A** et **4.5B**, la latence de l'onde N_1 du PAC et la latence du premier PA sont identiques. Pour évaluer leur degré de synchronisation, les PA sont automatiquement détectés par application d'une procédure de seuillage contrôlée visuellement par l'expérimentateur (seuil généralement fixé à 0,5 mV au-dessus du potentiel de base).

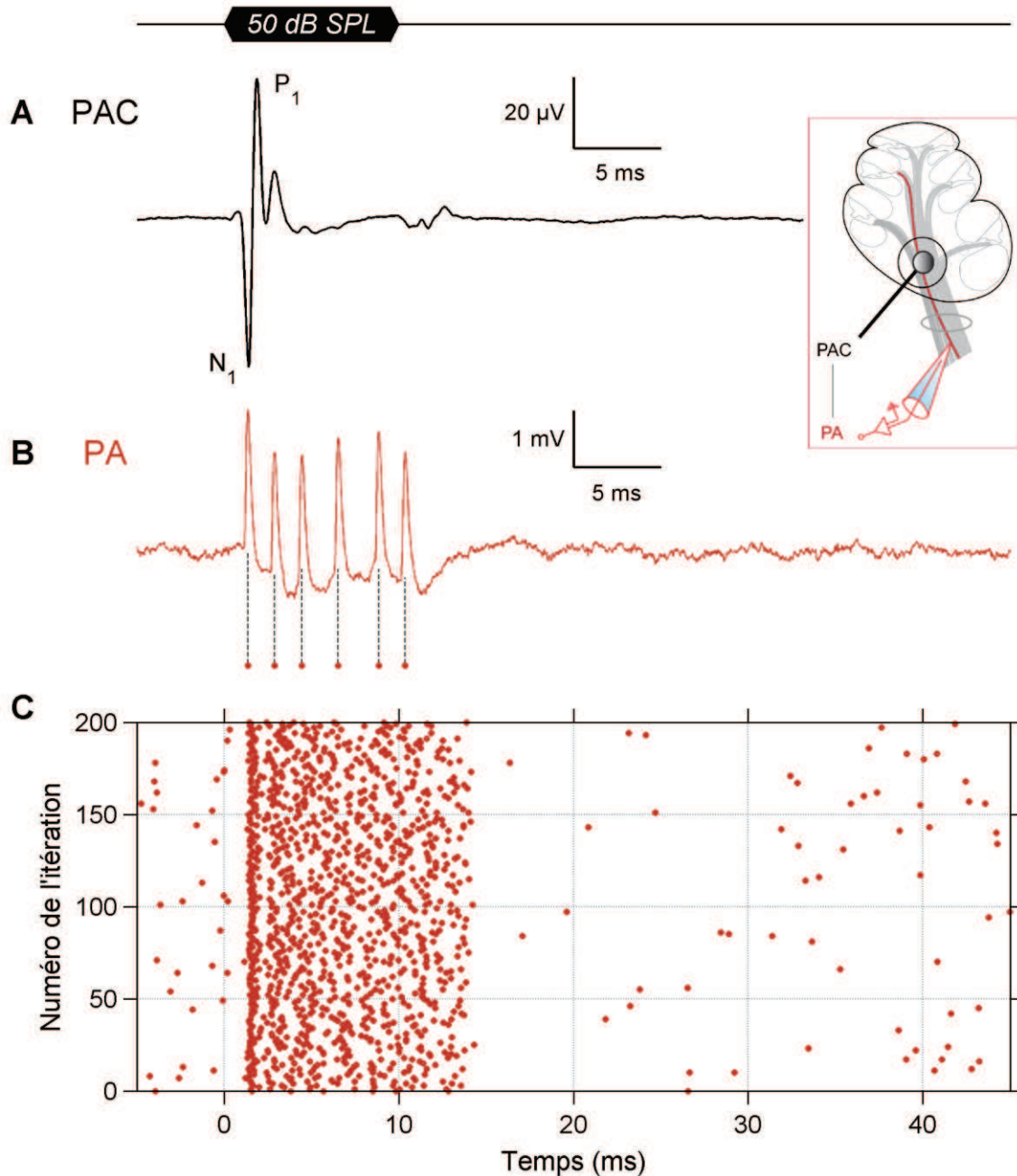


Figure 4.5: Enregistrement simultané du PAC du nerf auditif (A) et de la réponse d'une fibre (B, C). A et B: Le potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif (A) et les décharges d'une fibre (B) sont enregistrés simultanément en réponse à une bouffée tonale (montée= descente= 0,5 ms, plateau= 9 ms, 11 présentations/s, 500 présentations) centrées sur la fréquence caractéristique de la fibre (FC= 7127 Hz, AS=50 PA/s). **B.** Les points rouges signalent les instants de détection des 5 potentiels d'action (PA). **C.** Superposition des instants de détection relevés à chaque présentation de la stimulation. Chaque point a pour abscisse l'instant de détection du PA et pour ordonnée, le numéro de l'itération qui a déclenché ce PA.

Les instants de détection sont ensuite présentés sous la forme d'un nuage de points dans lequel chaque point a pour abscisse l'instant de détection du PA et pour ordonnée, le rang de la présentation qui a déclenché ce PA (**Figure 4.5C**). Avec ce type de stimulation répétée, il est possible que la fibre n'ait pas le temps de récupérer son niveau d'activité spontanée avant le début de chaque stimulation. C'est pourquoi nous parlerons d'activité basale pour désigner l'activité asynchrone enregistrée avant le début de la stimulation. Peu de temps après le début de la stimulation, la fibre génère un PA avec une latence reproductible (~1,5 ms dans cet exemple) d'une présentation à l'autre. Après ce premier PA évoqué bien synchronisé, la fibre réduit et désynchronise son activité tout en gardant un taux de décharge supérieur à son taux de décharge basal. À haut niveau de stimulation, la fibre continue à présenter une activité évoquée pendant quelques millisecondes après l'arrêt de la stimulation (Zheng et al., 2011). Ensuite son activité chute puis récupère progressivement (en quelques dizaines de millisecondes) une activité basale; ce mécanisme est désigné sous le terme de récupération post-stimulation.

Les enregistrements simultanés présentés dans la Figure 4.5 montrent que le PAC reflète la synchronisation des réponses unitaires en début de stimulation mais ne rend pas ou peu compte des réponses unitaires asynchrones émises pendant la durée de la stimulation (activité soutenue de la fibre).

Cet exemple n'est pas représentatif de toutes les réponses obtenues. En effet, la latence de l'onde N_1 du PAC et la latence du premier PA évoqué ne sont pas toujours égales suivant l'AS de la fibre. La **Figure 4.6** présente deux exemples d'enregistrements simultanés réalisés pour une fibre à haute-AS et une fibre à basse-AS d'une même préparation (même animal et même électrode d'enregistrement). Le niveau de stimulation augmentait de 20 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. L'analyse du PAC montre que l'amplitude de l'onde N_1 augmente avec le niveau de stimulation et que sa latence diminue. L'analyse des réponses unitaires révèle le même comportement avec une meilleure synchronisation des premiers PA évoqués (points colorés) et une diminution de leur latence moyenne avec le niveau de stimulation.

La **Figure 4.6A** montre les enregistrements simultanés obtenus pour une fibre à haute activité spontanée (50 PA/s) stimulée à sa fréquence de meilleure sensibilité (7127 Hz). Lorsque le niveau de stimulation augmente de 20 à 60 dB SPL, la latence de l'onde N_1 passe de 2 à 1,445 ms, soit des valeurs similaires à celles de la latence moyenne du premier PA

évoqué qui passe de 2,325 à 1,445 ms. Pour les plus hauts niveaux de stimulation, la bonne synchronisation de ces réponses est mise en évidence par la superposition des points colorés, représentant les instants de détection des premiers PA évoqués, et de la ligne pointillée verticale, représentant la latence de l'onde N_1 du PAC.

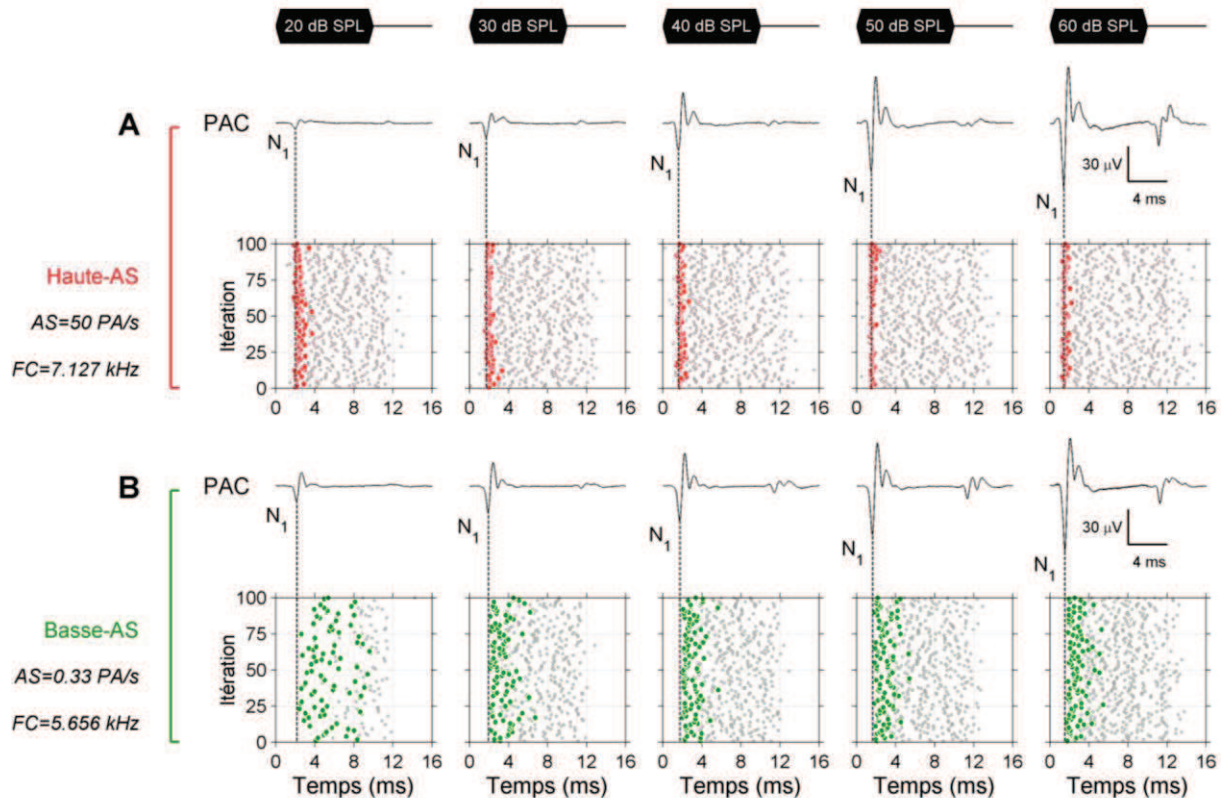


Figure 4.6: Enregistrements simultanés (unitaire/CAP) en fonction du niveau de stimulation pour une fibre à haute- (A) et basse-AS (B). Pour les enregistrements simultanés présentés en A (AS=50 PA/s, FC=7127 Hz, S=5 dB SPL) et B (AS=0,33 PA/s, FC=5656 Hz, S=20 dB SPL), les bouffées tonales (montée=descente=0,5 ms, plateau=9 ms, 11 présentations/s, 500 présentations) étaient présentées à la FC de la fibre avec un niveau de stimulation progressant de 20 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. La latence de l'onde N_1 du PAC est mise en évidence par une ligne pointillée verticale. Les instants de détection des PA sont présentés sous la forme d'un nuage de points dans lequel chaque point a pour abscisse l'instant de détection du PA et pour ordonnée, le numéro de l'itération qui a déclenché ce PA. Le premier PA évoqué de chaque itération est mis en évidence par un point de couleur vive (rouge, fibre à haute-AS ; vert : fibre à basse-AS).

La **Figure 4.6B** présente un autre exemple d'enregistrements simultanés obtenus pour une fibre à basse-AS (0,33 PA/s) stimulée à sa fréquence de meilleure sensibilité (5656 Hz). Dans cet exemple, la latence moyenne du premier PA évoqué est plus élevée que la latence de l'onde N_1 du PAC (2,375 ms contre 1,545 ms à 60 dB SPL). Les premiers PA évoqués sont peu synchronisés, et ce même au plus haut niveau de stimulation présenté. Ce faible degré de synchronisation des fibres à basse-AS pourrait donc expliquer pourquoi leur disparition, après application d'ouabaïne, n'a aucun effet sur l'amplitude du PAC.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons multiplié les enregistrements simultanés. Les caractéristiques des fibres enregistrées (AS: 0-105 PA/s, FC: 500 – 21357 Hz, S: 0-45 dB SPL) étaient conformes à celles décrites chez la gerbille (Schmiedt, 1989, Ohlemiller and Echteler, 1990, Muller, 1996). Seules les fibres dont la FC était supérieure à 2 kHz ($n = 106$ fibres) ont été retenues pour être comparée au PAC, évalué lui aussi au-dessus de 2 kHz dans cette étude (Figure 4).

Tous les enregistrements simultanés ont été effectués en réponse à une bouffée tonale (montée=descente=0,5 ms, plateau=9 ms, 11 présentations/s, 500 présentations) émise à 80 dB SPL. Ce niveau de stimulation a été choisi afin de permettre le recrutement des fibres à bas et à haut seuil d'activation (soit les fibres à haute- et à basse-AS, respectivement). Le PAC et les réponses unitaires étant enregistrés simultanément, leurs latences étaient impactées de la même façon par les conditions de stimulation (niveau, intervalle inter-stimulation, temps de montée, (Rhode and Smith, 1985, Relkin and Doucet, 1991, Heil and Irvine, 1997) et par le temps de propagation de l'onde le long de la cochlée (onde propagée). Ainsi, quelle que soit la fibre enregistrée, sa contribution au PAC est avant tout traduite par le délai observé entre ses premiers PA évoqués et l'onde N_1 du PAC. C'est donc ce délai que nous avons pris en compte pour l'analyse des résultats.

Deux approches ont été utilisées pour analyser les résultats. La première consiste à évaluer la latence et la dispersion temporelle du premier PA évoqué par la stimulation (Buran et al., 2010, Furman et al., 2013), tandis que la seconde approche modélise la contribution unitaire de la fibre au PAC (Goldstein and Kiang, 1958).

La **Figure 4.7** illustre ces deux approches sur 3 exemples représentatifs de fibres à basse-, moyenne- et haute-AS. Dans ces exemples, l'instant d'occurrence de l'onde N_1 du PAC (**Figure 4.7A**) est comparé aux propriétés temporelles des réponses unitaires (**Figure**

4.7B-E). La première approche utilisée pour étudier la réponse synchrone des PA évoqués ne prend en compte que le 1^{er} PA évoqué à chaque présentation de la stimulation. Les nuages de points de la **Figure 4.7B** présentent les instants de détection des PA émis au cours des 6 premières millisecondes après le début de la stimulation. Chaque point a pour abscisse l'instant de détection du PA et pour ordonnée, le numéro de l'itération qui a déclenché ce PA. Sur ces nuages de points, le 1^{er} PA évoqué de chaque itération est mis en évidence par un point de couleur vive tandis que l'instant de détection de l'onde N₁ du PAC est indiqué par une ligne verticale pointillée (Figure 7A). Les 3 exemples représentatifs montrés dans cette figure correspondent aux réponses obtenues pour une fibre à basse- (AS<0,1 PA/s, FC=4 kHz), moyenne- (AS=3 PA/s, FC=4,237 kHz), et haute-AS (AS=50 PA/s, FC=7,127 kHz).

Dans ces exemples, le positionnement des points colorés par rapport à la ligne pointillée verticale montre que le 1^{er} PA évoqué de la fibre à haute-AS (rouge) est bien synchronisé avec l'onde N₁ du PAC, tandis que le 1^{er} PA évoqué de la fibre à basse-AS (vert) est retardé et peu synchronisé par rapport à l'onde N₁ du PAC. Le 1^{er} PA évoqué de la fibre à moyenne-AS (bleu) présente un profil intermédiaire avec une moins bonne synchronisation que la fibre à haute-AS, mais une activation plus rapide et mieux synchronisée que la fibre à basse-AS.

Pour quantifier ces observations, nous avons construit l'histogramme de latence du 1^{er} PA évoqué (**Figure 4.7C**, *FSLH: "First Spike Latency Histogram"*) représentant le pourcentage de 1^{er} PA contenus dans chaque intervalle temporel de 100 μ s. Cet histogramme permet d'étudier le retard et la dispersion temporelle du 1^{er} PA évoqué. Une bonne synchronisation des réponses se traduit par un histogramme étroit et ample, comme celui obtenu pour la fibre à haute-AS, tandis qu'une mauvaise synchronisation des réponses donne lieu à un histogramme plus large et de faible amplitude, comme celui obtenu pour la fibre à basse-AS. La dispersion temporelle a été quantifiée en calculant l'écart-type de la latence du 1^{er} PA évoqué (*FSL jitter*). D'autre part, le retard du 1^{er} PA évoqué a été quantifié en calculant l'intervalle de temps séparant l'onde N₁ (ligne pointillée verticale) et le mode du *FSLH* (pic de l'histogramme de latence du 1^{er} PA évoqué). Tandis que cet intervalle de temps est très court pour la fibre à haute-AS (45 μ s), il est nettement plus long pour la réponse retardée de la fibre à basse-AS (505 μ s).

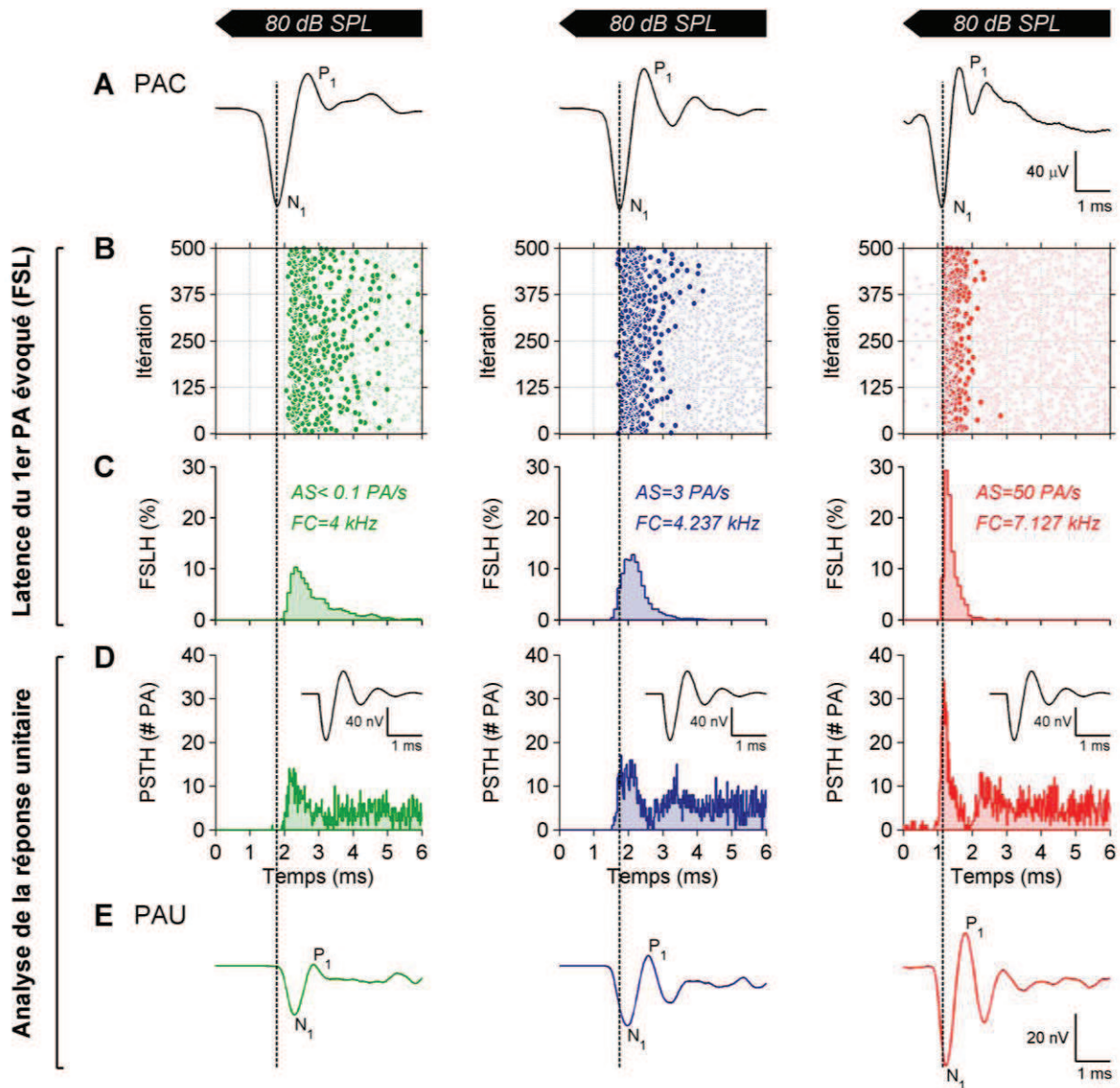


Figure 4.7: Contribution des réponses unitaires au PAC du nerf auditif. **A et B:** Le potentiel d'action composite du nerf auditif (PAC) et les potentiels d'action (PA) d'une fibre sont enregistrés simultanément en réponse à une bouffée tonale (montée=descente=0,5 ms, plateau=9 ms, 11 présentations/s, 500 présentations, 80 dB SPL) centrée sur la fréquence caractéristique de la fibre (FC). Ces trois exemples présentent les réponses obtenues pour une fibre à basse ($\leq 0,5$ PA/s), moyenne ($0,5 < AS \leq 18$ PA/s), et haute (> 18 PA/s) activité spontanée (AS). La ligne pointillée verticale indique la latence de l'onde N_1 du PAC (A). Les instants de détection des décharges de la fibre sont représentés par des points de couleur pâle (B) tandis que le premier potentiel d'action évoqué est mis en évidence par un gros point de couleur vive. **C:** Histogramme de latence des 1^{er} PA évoqués (FSLH: First Spike Latency Histogram) indiquant le pourcentage de 1^{er} PA obtenus dans chaque intervalle de temps de 100 μ s. **D:** Histogramme temporel de décharge (PSTH: Peri-Stimulus Time Histogram) indiquant le nombre de PA apparus dans chaque intervalle de temps de 20 μ s. Encart: onde amortie représentant la forme d'onde extracellulaire d'un PA enregistré depuis la niche de la fenêtre ronde (Prijs, 1986). **E:** Contribution de la réponse unitaire de la fibre au PAC (PAU: Potentiel d'Action Unitaire) modélisée par convolution du PSTH (D) et de l'onde amortie (encart dans D) selon la méthode proposée par (Goldstein and Kiang, 1958).

Évalués sur 106 fibres, ces paramètres d'étude du 1^{er} PA évoqué sont représentés en fonction de l'activité spontanée (**Figures 4.8A,B**) et de la fréquence caractéristique (**Figures 4.8E,F**) des fibres étudiées. Comme le suggéraient les exemples représentatifs exposés dans la Figure 4.7, la latence et le degré de synchronisation du 1^{er} PA évoqué dépendent significativement du niveau d'activité spontanée de la fibre. L'effet observé sur l'intervalle de temps séparant l'onde N₁ et le mode du *FSLH* (**Figure 4.8A**), montre que le premier PA évoqué des fibres à basse-AS est significativement retardé (retard moyen de $665 \pm 49 \mu s$ contre $360 \pm 30 \mu s$ pour les fibres à haute-AS, $p < 0,001$). À ce retard s'ajoute une mauvaise synchronisation en début de stimulation, comme le révèle l'effet observé sur l'écart-type de la latence du 1^{er} PA évoqué (*FSL jitter*, **Figure 4.8B**), avec un écart-type moyen de $967 \pm 92 \mu s$ pour les fibres à basse-AS contre $545 \pm 38 \mu s$ pour les fibres à haute-AS ($p < 0,001$).

L'étude de ces paramètres en fonction de la fréquence caractéristique des fibres ne révèle aucun effet significatif (**Figures 4.8E et 4.8F, Tableau 4.1**).

Les résultats obtenus avec cette première approche montrent que le 1^{er} PA évoqué des fibres à basse-AS est moins bien synchronisé, et plus retardé par rapport à l'onde N₁ du PAC, que le 1^{er} PA évoqué des fibres à haute-AS. Le 1^{er} PA évoqué des fibres à moyenne-AS présente une cinétique d'activation intermédiaire.

Dans la deuxième analyse utilisée, tous les PA émis par la fibre ont été pris en compte. À partir du nombre de PA détectés dans chaque intervalle de temps de $20 \mu s$ (période d'échantillonnage du PAC), nous avons construit l'histogramme temporel de décharge de chaque réponse unitaire (*PSTH: Peri-Stimulus Time Histogram*). La **Figure 4.7D** présente les *PSTH* des trois fibres de la Figure 4.7. Le *PSTH* de la fibre à haute-AS (rouge) présente un pic d'amplitude bien synchronisé avec l'onde N₁ du PAC. La forte ressemblance entre le pic du *PSTH* et le *FSLH* suggère que ce pic représente essentiellement la distribution du 1^{er} PA évoqué.

Juste après ce pic d'amplitude, la forte diminution de l'activité de la fibre reflète probablement la période réfractaire absolue de la fibre. Le taux de décharge de la fibre atteint ensuite un taux de décharge soutenu correspondant à la génération asynchrone et continue de PA pendant la durée de la stimulation. Le *PSTH* de la fibre à basse AS (vert) est retardé par rapport à l'onde N₁ et de faible amplitude en début de réponse. Cette faible amplitude

reflète la faible synchronisation du 1^{er} PA évoqué. Le *PSTH* de la fibre à moyenne AS (bleu) présente des caractéristiques intermédiaires, avec une réponse peu retardée par rapport à l'onde N₁, mais une faible amplitude en début de réponse. À partir de ces *PSTH*, nous avons utilisé la méthode proposée par (Goldstein and Kiang, 1958), pour modéliser la contribution de chaque réponse unitaire au PAC (**Figure 4.7E**, PAU: Potentiel d'Action Unitaire).

La modélisation des Potentiels d'Action Unitaires (PAU, **Figure 4.7E**) prend en compte les résultats de (Prijs, 1986) et (Versnel et al., 1992) montrant que chaque PA généré par une fibre contribue à l'activité cochléaire sous la forme d'une onde amortie (**encart dans la Figure 4.7D**) d'égale amplitude et d'égale latence quelle que soit son activité spontanée et sa fréquence caractéristique.

C'est en convoluant cette onde amortie (encart dans la Figure 7D) avec le *PSTH* de chaque réponse unitaire (Figure 7D) que la méthode proposée par Goldstein et Kiang (1956) modélise la contribution de chaque réponse unitaire au PAC. Les PAU ainsi obtenus (**Figure 4.7E**) permettent de définir de nouveaux paramètres d'étude de la réponse unitaire: le délai de la réponse unitaire par rapport à l'onde N₁ du PAC peut être évaluée à travers l'intervalle de temps compris entre l'onde N₁ du PAC et l'onde N₁ du PAU, tandis que la synchronisation de la réponse unitaire peut être étudiée à partir de l'amplitude du PAU.

Évalués sur les 106 enregistrements simultanés, ces paramètres sont représentés en fonction de l'activité spontanée (**Figures 4.8C,D**) et de la fréquence caractéristique (**Figures 4.8G,H**) des fibres étudiées (**Tableau 4.1**). À nouveau, seule l'activité spontanée des fibres a un effet significatif sur les paramètres étudiés. En début de stimulation, les fibres à basse-AS se distinguent par leur réponse retardée ($848 \pm 93 \mu\text{s}$ contre $465 \pm 32 \mu\text{s}$ pour les fibres à haute AS, $p < 0,001$) et de faible amplitude ($17,4 \pm 1,6 \text{ nV}$ contre $35,4 \pm 1,5 \text{ nV}$ pour les fibres à haute AS, $p < 0,001$).

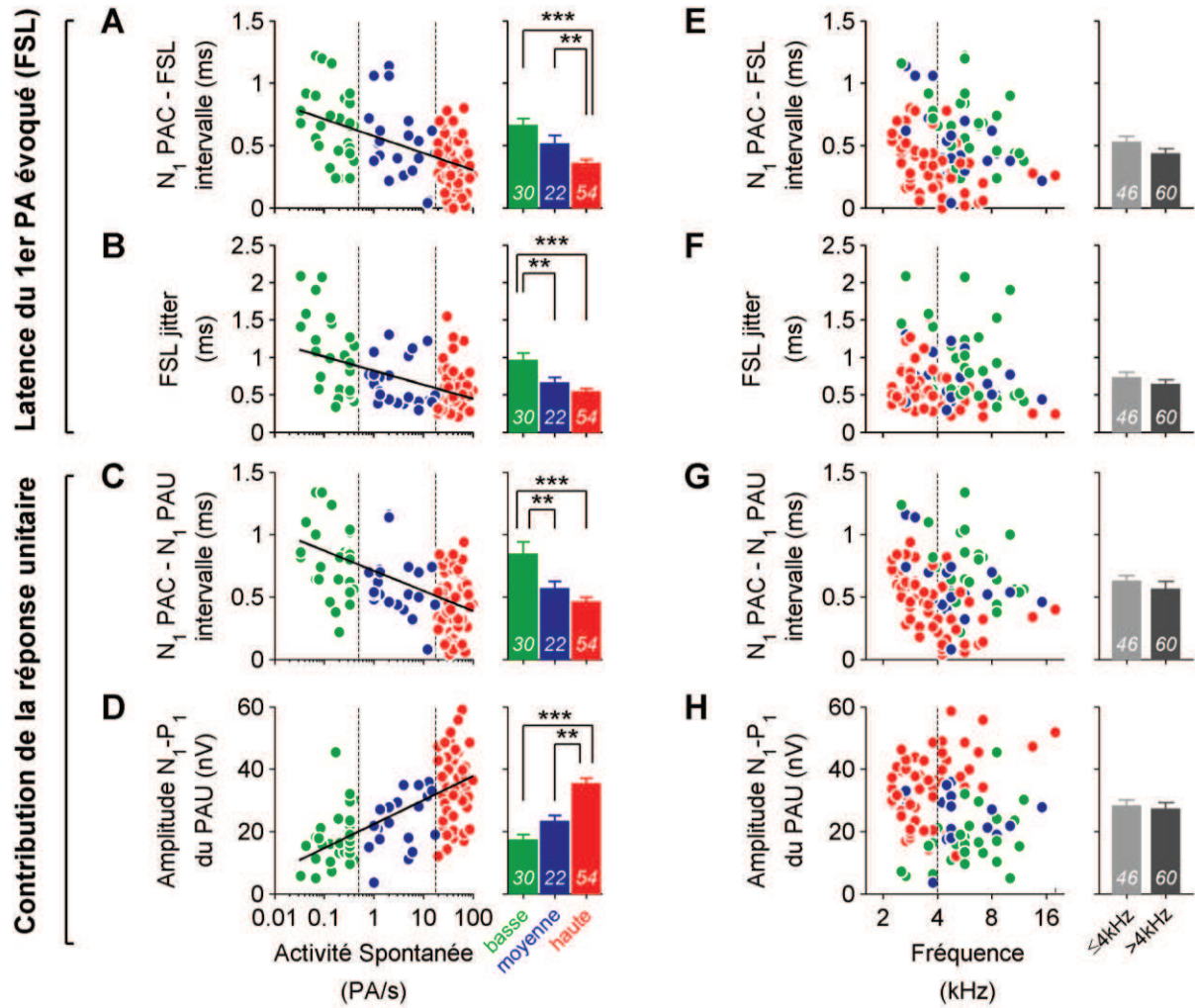


Figure 4.8: Degré de synchronisation des fibres ($n = 106$) en fonction de leur activité spontanée (A-D) et de leur fréquence caractéristique (E-H). Les couleurs correspondent aux fibres à basse ($< 0,5$ PA/s), moyenne ($0,5 < AS < 18$ PA/s) et haute (> 18 PA/s) activité spontanée (AS). Les lignes pointillées verticales mettent en évidence les différents groupes de fibres correspondant aux quantifications (moyenne \pm erreur standard) présentées sur le graphique de droite. Une droite d'ajustement oblique est superposée aux nuages de points lorsqu'un effet significatif est démontré (Anova à un facteur et procédure de comparaisons multiples, ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$). **A, E:** Intervalle de temps entre l'onde N₁ du PAC et le mode du FSLH (First Spike Latency Histogram) en fonction de l'activité spontanée (**A**) et de la fréquence caractéristique (**E**) de la fibre. Seule l'activité spontanée de la fibre a un effet significatif sur la latence du premier PA évoqué (modèle d'ajustement: y (ms) = $0,58 - 0,14 \log(AS)$). **B, F:** Ecart type du FSLH (First Spike Latency Histogram) en fonction de l'activité spontanée (**B**) et de la fréquence caractéristique (**F**) de la fibre. Seule l'activité spontanée de la fibre a un effet significatif sur la synchronisation du premier PA évoqué (modèle d'ajustement: y (ms) = $0,82 - 0,19 \log(AS)$). **C, G:** Intervalle de temps compris entre l'onde N₁ du PAC et l'onde N₁ du PAU (Potentiel d'Action Unitaire) en fonction de l'activité spontanée (**C**) et de la fréquence caractéristique (**G**) des fibres. Seule l'activité spontanée de la fibre a un effet significatif sur la latence de la réponse unitaire (modèle d'ajustement: y (ms) = $0,72 - 0,17 \log(AS)$). **D, H:** Amplitude N₁P₁ du PAU en fonction de l'activité spontanée (**D**) et de la fréquence caractéristique (**H**) des fibres. Seule l'activité spontanée de la fibre a un effet significatif sur l'amplitude de la réponse (modèle d'ajustement: y (nV) = $22,1 + 7,8 \log(AS)$).

Tableau 4.1: Moyennes et erreurs standards des données présentées dans la Figure 4.8. Ces paramètres sont évalués à partir d'enregistrements simultanés (106 fibres). Les fibres sont regroupées selon leur niveau d'activité spontanée (AS) et leur fréquence caractéristique (FC).

| | Délai N ₁ PAC - FSL | Écart-type FSLH = <i>Jitter FSL</i> | Délai N ₁ PAC - N ₁ PAU | Amplitude N ₁ -P ₁ du PAU |
|----------------------------|-----------------------------------|--|--|--|
| Basse- AS (<i>n</i> = 30) | 665 ± 49 µs | 967 ± 92 µs | 848 ± 93 µs | 17,4 ± 1.6 nV |
| Moyenne- (<i>n</i> = 22) | 518 ± 62 µs | 664 ± 65 µs | 569 ± 56 µs | 23,3 ± 1.8 nV |
| Haute- AS (<i>n</i> = 54) | 360 ± 30 µs | 545 ± 38 µs | 465 ± 32 µs | 35,4 ± 1.5 nV |
| FC ≤4 kHz (<i>n</i> = 46) | 533 ± 40 µs | 739 ± 60 µs | 633 ± 37 µs | 28,3 ± 1.7 nV |
| FC >4 kHz (<i>n</i> = 60) | 438 ± 36 µs | 651 ± 51 µs | 566 ± 58 µs | 27,4 ± 1.8 nV |

4.3. Activité soutenue des fibres du nerf auditif

Le manque de sensibilité de la réponse synchrone étant expliqué par la réponse retardée et désynchronisée des fibres à basse-AS en début de stimulation, nous nous sommes intéressés à l'activité soutenue des fibres du nerf auditif.

4.3.1. Contribution unitaire à l'activité soutenue

Pour comparer la contribution des fibres à basse- et à haute-AS à la réponse soutenue du nerf auditif, nous avons analysé les réponses unitaires soutenues (*n* = 160 fibres) évoquées par une bouffée tonale de 50 ms présentée à la FC de la fibre (enveloppe trapézoïdale, montée=descente=1 ms, plateau=48 ms, 10 présentations/sec, 50 présentations/niveau). La **Figure 4.9A** présente les réponses d'une fibre à basse- (vert) et à haute-AS (rouge) pour un niveau de stimulation allant de 0 à 80 dB SPL par pas de 8 dB.

Nous avons mesuré le taux de décharge soutenu de ces fibres pendant les 20 dernières millisecondes de la stimulation (lignes pointillées verticales sur la Figure 4.9A) et nous l'avons exprimé en fonction du niveau de stimulation (**Figure 4.9B**). Pour un niveau de stimulation donné, la réponse évoquée de chaque fibre correspond à la différence entre son

taux de décharge soutenu et son taux d'activité spontanée (flèches sur la Figure 4.9B). Cette réponse évoquée a été mesurée à 60 et 80 dB SPL, pour les 160 fibres enregistrées. À ces deux niveaux de stimulation, aucune différence significative n'est observée entre les fibres à basse- et à haute-AS (**Figure 4.9C**).

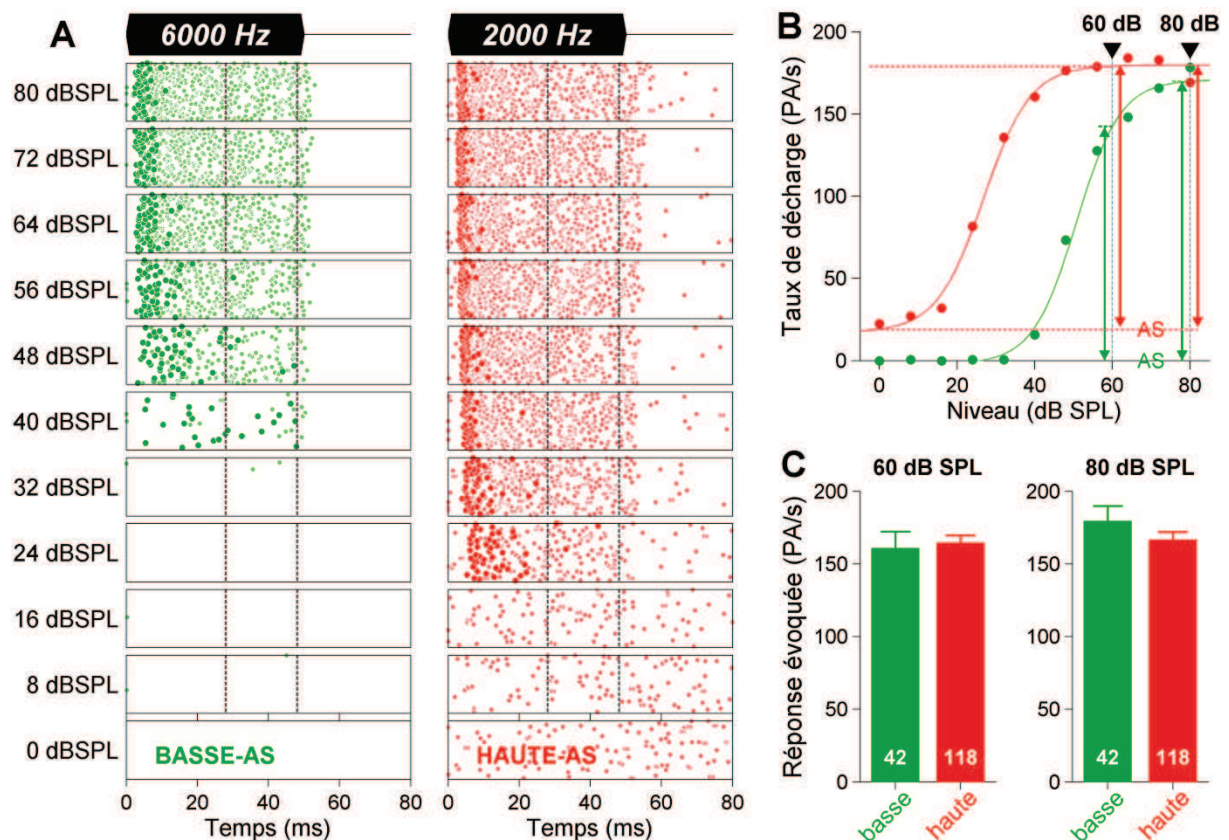


Figure 4.9: Contribution unitaire à la réponse soutenue. Cette étude est réalisée à partir des réponses unitaires ($n = 160$ fibres) enregistrées en réponse à une bouffée tonale de 50 ms présentée à la fréquence caractéristique de la fibre (enveloppe trapézoïdale, montée=descente=1 ms, 10 présentations/sec, 50 présentations/niveau). **A.** Réponses unitaires d'une fibre à basse-AS (vert, AS=0 PA/s) et d'une fibre à haute-AS (rouge, AS=20 PA/s) pour des niveaux de stimulation allant de 0 à 80 dB SPL par pas de 8 dB. Le premier PA évoqué par chaque présentation de la stimulation est mis en évidence par un gros point de couleur vive. Les lignes pointillées verticales mettent en évidence les 20 dernières millisecondes du plateau de la stimulation, pendant lesquelles le taux de décharge soutenu est mesuré. **B.** Représentation du taux de décharge soutenu des fibres présentées en (A) en fonction du niveau de stimulation. La courbe d'ajustement appliquée aux points de mesure correspond à un modèle sigmoïdal inspiré de (Sachs and Abbas, 1974). À 60 et 80 dB SPL, la réponse évoquée des fibres est calculée à partir de la différence entre leur taux de décharge soutenu (évalué à partir de la courbe d'ajustement) et leur taux d'activité spontanée (AS). **C.** Réponse soutenue évoquée à 60 et 80 dB SPL ($n = 160$ fibres). Aucune différence significative n'est observée entre les fibres à basse- et à haute-AS (Test de Student, $p > 0,05$).

Ce résultat est très intéressant car il suggère qu'à 60 dB SPL, les fibres à basse- et à haute-AS contribuent à part égale à la réponse soutenue du nerf auditif. Notons que de 60 à 80 dB SPL, l'activité évoquée des fibres à basse-AS continue globalement à progresser (de 160 ± 11 PA/s à 180 ± 10 PA/s, $n = 42$), tandis que l'activité évoquée des fibres à haute-AS semble saturer (164 ± 5 PA/s à 60 dB SPL, et 166 ± 5 PA/s à 80 dB SPL, $n = 118$).

Ces résultats préliminaires suggèrent donc que contrairement à la réponse synchrone du nerf auditif, qui reflète surtout l'activité des fibres à haute-AS, la réponse soutenue du nerf auditif pourrait mieux rendre compte de l'activité de l'ensemble des fibres auditives.

Ces résultats nous ont encouragés à développer une mesure électrophysiologique permettant d'étudier la réponse soutenue du nerf auditif.

4.3.2. Réponse soutenue du nerf auditif

Pour mesurer l'activité soutenue des fibres du nerf auditif en potentiel de champ lointain, nous avons utilisé la méthode proposée par Dolan et ses collaborateurs (Dolan et al., 1990). Cette approche présente l'avantage d'être transposable à l'homme à l'aide d'enregistrements trans-tympaniques (Electrocochléographie-ECochG). Initialement mise au point chez le cochon d'inde, cette technique a été utilisée pour le monitoring de l'activité spontanée (Cazals et al., 1998) et évoquée du nerf auditif (Cazals and Huang, 1996). Contrairement à l'analyse de la réponse synchrone, menée dans le domaine temporel, l'analyse de la réponse soutenue est conduite dans le domaine fréquentiel.

Pour commencer, nous avons donc étudié les composantes fréquentielles de l'activité cochléaire en représentant la densité spectrale de puissance (DSP) du signal enregistré au contact de la cochlée (électrode boule implantée dans la niche de la fenêtre ronde de gerbille comme pour le PAC). La **Figure 4.10** présente l'activité cochléaire spontanée de 30 gerbilles contrôles. Les courbes individuelles sont caractérisées par une décroissance rapide de la DSP entre 0 et 398 ± 64 Hz (moyenne \pm écart type), suivie d'une augmentation d'amplitude jusqu'à 903 ± 88 Hz, puis d'une diminution lente et linéaire au-delà de 903 Hz avec une pente proche de -5 dB/kHz.

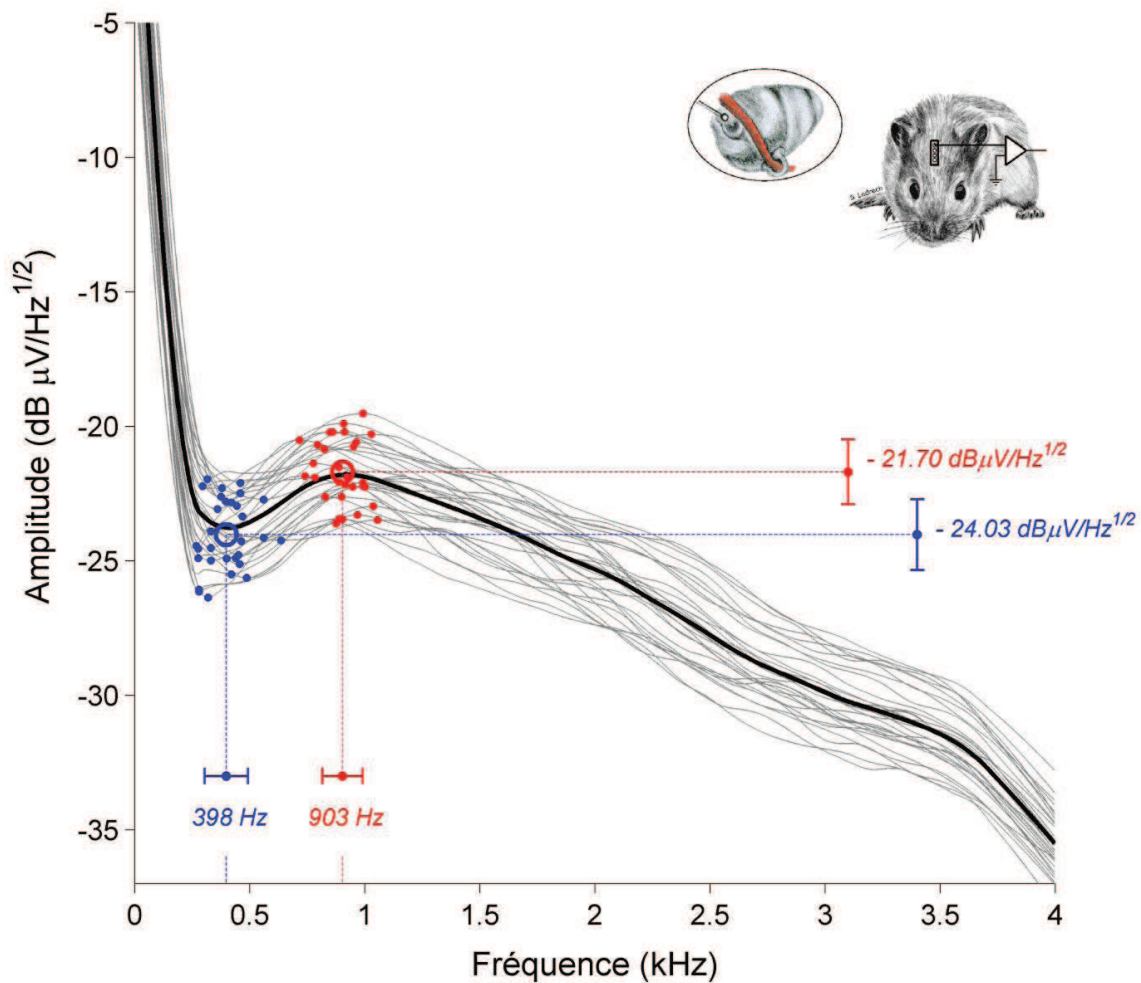


Figure 4.10 : Densité spectrale de puissance (DSP) de l'activité spontanée enregistrée au contact de la cochlée. Les 30 traces grises correspondent aux DSP enregistrées chez 30 gerbilles normoentendantes en l'absence de stimulation acoustique. Elles sont toutes caractérisées par un dôme centré autour de 900 Hz. Sur chaque courbe, le petit point bleu correspond au creux précédant le dôme. L'anneau bleu désigne la position moyenne des 30 points bleus. L'abscisse et l'ordonnée de ce point indiquent respectivement une fréquence moyenne de 398 ± 94 Hz et une amplitude moyenne de $-24,03 \pm 1,32$ $\text{dB}\mu\text{V}/\text{VHz}$. Les petits points rouges indiquent la position du dôme pour les 30 DSP individuelles et l'anneau rouge représente la position moyenne du dôme. L'abscisse et l'ordonnée de l'anneau indiquent une fréquence moyenne de 903 ± 88 Hz avec une amplitude moyenne de $-21,70 \pm 1,21$ $\text{dB}\mu\text{V}/\text{VHz}$. Notons que la cassure de pente dans la diminution de la densité de puissance à partir de 3500 Hz n'est pas physiologique. Elle est liée au filtre anti-repliement appliqué en amont de la numérisation des signaux afin de respecter le théorème de Shannon. Dans cette légende, les valeurs numériques sont indiquées par (moyenne \pm écart type).

Comme démontré chez le cochon d'inde (Dolan et al., 1990, McMahon and Patuzzi, 2002, Patuzzi et al., 2004, Searchfield et al., 2004), nous avons postulé que le dôme spectral observé autour de 900 Hz chez la gerbille reflète l'activité des fibres du nerf auditif. Pour tester cette hypothèse nous avons procédé en deux étapes.

Tout d'abord, nous avons progressivement augmenté l'activité des fibres du nerf auditif en exposant l'animal à une bande de bruit tiers d'octave présentée de 0 à 60 dB SPL. La **Figure 4.11A** montre les DSP obtenues chez une gerbille contrôle en réponse à une bande de bruit centrée sur 2 kHz. Au sein de la fenêtre d'analyse spectrale choisie (0 - 4 kHz), deux composantes spectrales progressent avec le niveau de stimulation: une composante centrée sur le 900 Hz et une composante centrée sur la fréquence de stimulation (2 kHz pour cet exemple). Pour démontrer que la gradation du dôme spectral centré sur 900 Hz reflète l'activité soutenue des fibres du nerf auditif, nous avons ensuite appliqué une solution de tétrodoxtine (TTX) dans la niche de la fenêtre ronde de la cochlée.

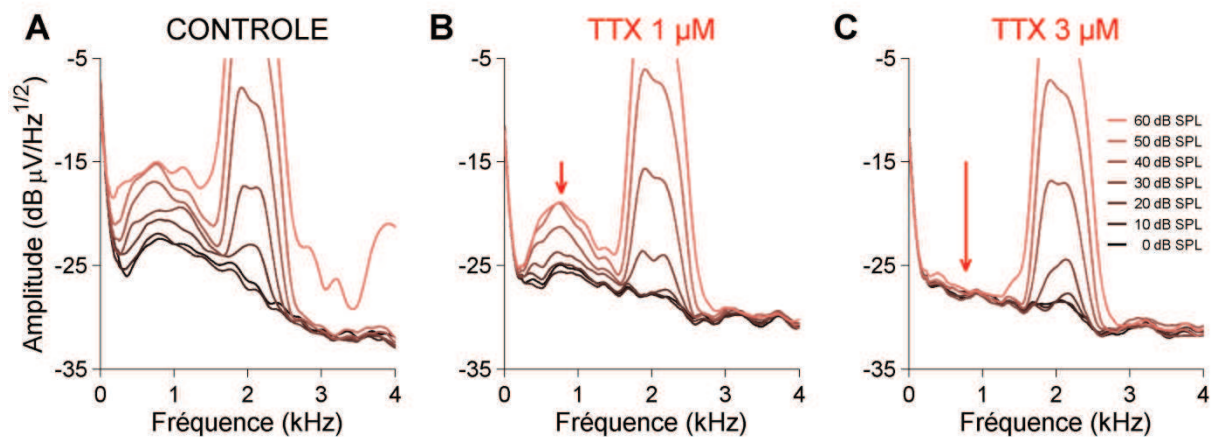


Figure 4.11 : Origine du dôme spectral enregistré au contact de la cochlée. A. Superposition des densités spectrales de puissance (DSP) enregistrées en réponse à une bande de bruit tiers d'octave centrée sur 2 kHz et présentée de 0 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. Chaque tracé est moyenné pendant 20 secondes afin d'obtenir une DSP lissée et stabilisée. Le dôme spectral se grade avec le niveau de stimulation ainsi qu'une deuxième composante correspondant à la bande fréquentielle de stimulation. **B et C.** DSP enregistrées après application d'une solution de tétrodoxtine (TTX) sur la membrane de la fenêtre ronde. Après application d'une faible concentration (1 μM , 30 mn) la TTX diminue l'amplitude du dôme spectral (flèche rouge) et réduit son activité évoquée (**B**). L'application d'une seconde concentration plus élevée (3 μM , 30 mn) fait disparaître le dôme spectral (**C**). Seule la composante microphonique correspondant à la bande fréquentielle de stimulation continue à se grader avec le niveau de stimulation.

En bloquant sélectivement les canaux sodium voltage-dépendants, la TTX empêche l'initiation des potentiels d'action dans les fibres du nerf auditif (McMahon and Patuzzi, 2002). Comme le montre la **Figure 4.11B**, l'application d'une faible concentration de TTX (1 μM pendant 30 mn) affecte peu le dôme à 900 Hz. En revanche, l'application 30 minutes plus tard d'une solution plus concentrée de TTX (3 μM pendant 30 mn) abolit complètement le

dôme centré sur le 900 Hz, sans altérer la composante centrée sur le 2 kHz (**Figure 4.11C**). Cette dernière composante, centrée sur la fréquence de stimulation, reflète le potentiel récepteur des cellules ciliées (principalement externes). Il s'agit donc du potentiel microphonique.

Cette expérience démontre donc, comme chez le cochon d'inde, que le dôme centré sur 900 Hz est d'origine neurale et reflète l'activité des fibres du nerf auditif. Cette composante spectrale pourrait être liée à la forme d'onde des potentiels d'action extracellulaires observée en champ lointain depuis la niche de la fenêtre ronde (Prijs, 1986, Versnel et al., 1992).

Pour étudier les réponses soutenues des fibres réparties le long de la cochlée, nous avons enregistré l'activité évoquée par des bandes de bruit tiers d'octave centrées sur des fréquences allant de 2 à 25 kHz (**Figure 4.12**). Pour chacune de ces bandes de bruit, 7 niveaux de stimulation étaient testés (de 0 à 60 dB SPL par pas de 10 dB).

Pour isoler spécifiquement l'activité évoquée par la stimulation, nous avons soustrait la DSP enregistrée à 0 dB SPL (estimation raisonnable de l'activité spontanée) aux DSP obtenues à plus hauts niveaux de stimulation. (**Figure 4.13**). La soustraction des DSP enregistrées à 0 dB SPL a pour avantage d'éliminer toutes les composantes électrophysiologiques indépendantes du niveau de stimulation (myogramme, rythme cardiaque, activité du nerf facial et du nerf vestibulaire) pour ne garder que les composantes répondant au son. Il est alors facile de séparer la composante neurale, localisée au-dessous de 2 kHz, de la composante microphonique, centrée sur la fréquence de stimulation.

Cependant, pour les fréquences de stimulation (F_c) inférieures à 3,15 kHz, la composante microphonique se rapproche de la réponse neuronale. Nous avons alors décidé de placer la limite entre les réponses neurale et sensorielle à une $\frac{1}{2}$ octave au-dessous de la fréquence de stimulation (soit $F_c/\sqrt{2}$). La **Figure 4.14** illustre sur un exemple représentatif cette délimitation entre composante neurale (surface bleue) et composante sensorielle (surface grise).

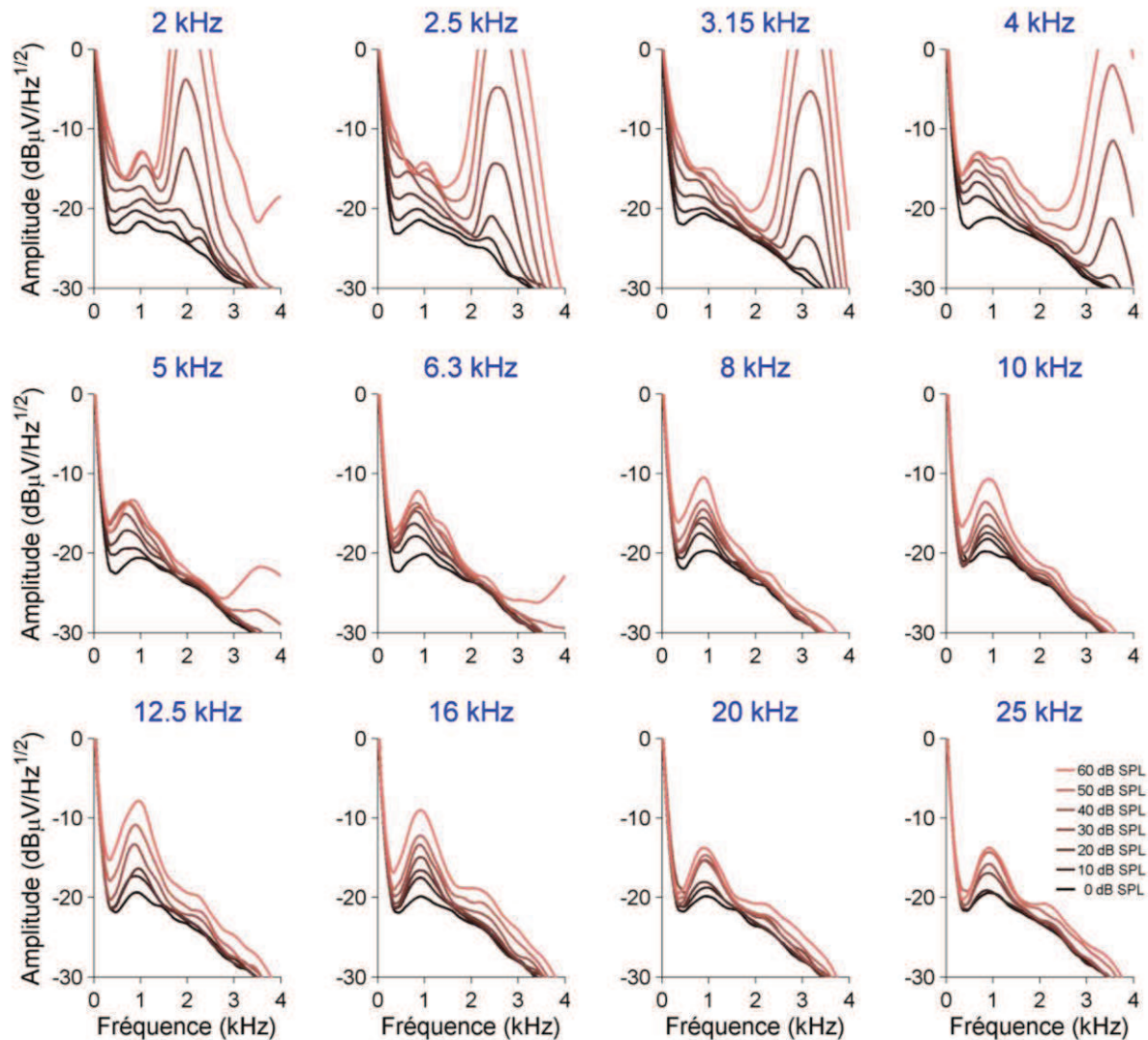


Figure 4.12: Densité spectrale de puissance (DSP) de l'activité cochléaire évoquée. Chaque graphique présente la superposition des DSP de l'activité cochléaire enregistrée en réponse à une bande de bruit tiers d'octave présentée pendant 20 secondes, de 0 à 60 dB SPL par pas de 10 dB (fréquence centrale de stimulation indiquée en bleu au-dessus de chaque graphique). Ce type de représentation met en évidence la gradation du dôme neural avec le niveau acoustique de stimulation. Pour les fréquences centrales de stimulation inférieures à 8 kHz, la fenêtre d'analyse spectrale choisie (0-4 kHz) laisse apparaître la composante microphonique, dont la bande fréquentielle correspond à la bande fréquentielle de stimulation. Notons que la cassure de pente parfois visible à partir de 3500 Hz n'est pas physiologique, elle est liée au filtre d'acquisition anti-repliement.

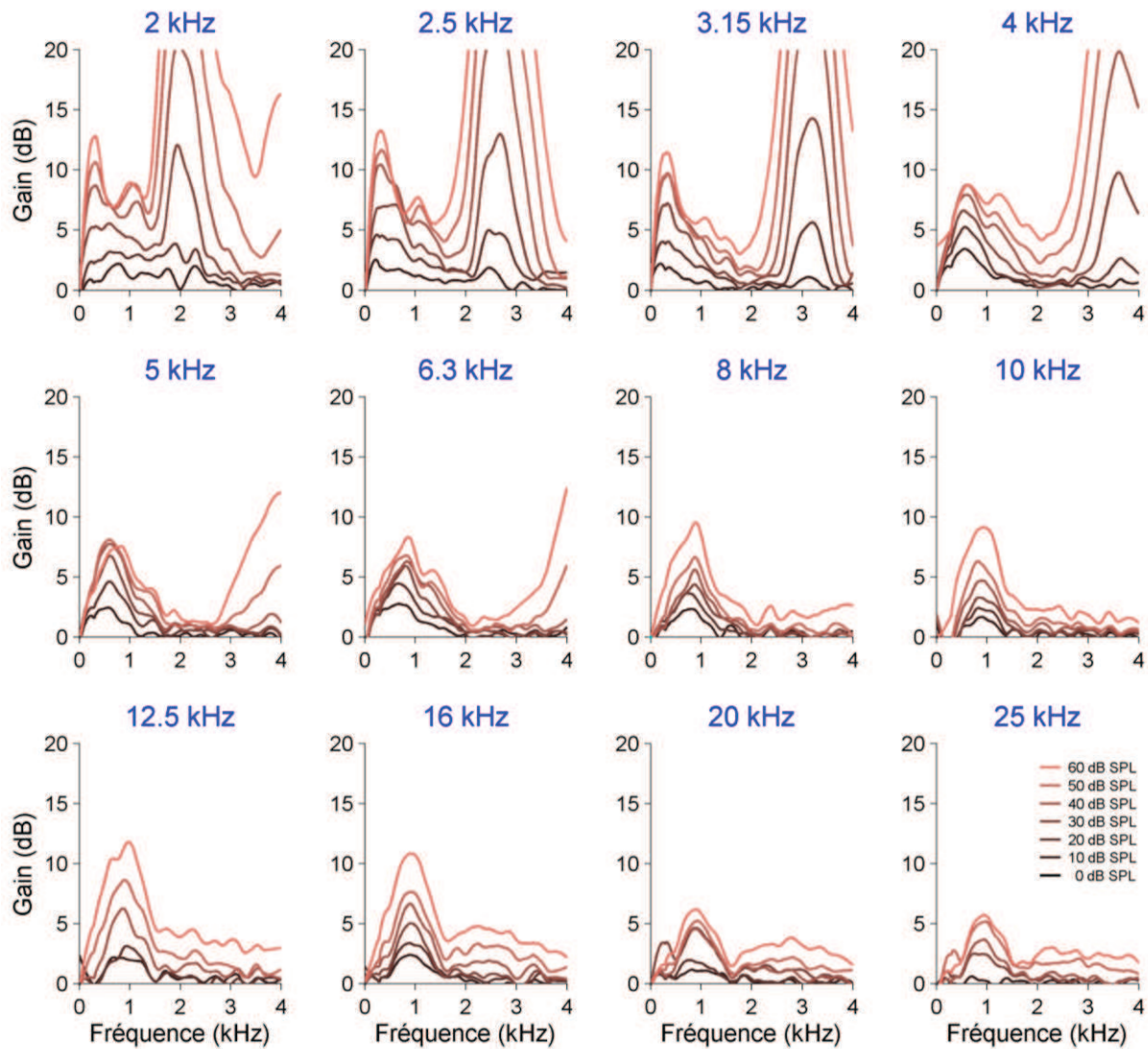


Figure 4.13: Courbes de gain d'activité (dB) reflétant l'activité évoquée par les différentes stimulations acoustiques. Ces résultats sont obtenus à partir des DSP enregistrées chez une gerbille (figure 10) en soustrayant la DSP enregistrée à 0 dB SPL ($\text{dB}\mu\text{V}/\text{VHz}$) aux DSP enregistrées à plus hauts niveaux de stimulation acoustique ($\text{dB}\mu\text{V}/\text{VHz}$). Ces gains d'activité (dB) permettent d'isoler l'activité évoquée par des bandes de tiers d'octave présentées de 10 à 60 dB SPL par pas de 10 dB pendant 20 secondes (fréquence centrale de stimulation indiquée en bleu au dessus de chaque graphique).

Pour convertir la réponse neurale en une valeur numérique, nous avons calculé la surface de la réponse neurale (surfaces bleues de la Figure 4.14) pour chaque fréquence et chaque niveau testé. Menée sur un échantillon de 10 gerbilles contrôles, cette analyse nous a alors permis de construire les courbes iso-niveau présentées dans la **Figure 4.15A**. Cette représentation est très intéressante car elle met en évidence des différences de progression le long de l'axe tonotopique. De 0 à 40 dB SPL, les réponses neurales sont plus amples dans

les basses fréquences. En effet, à bas niveau de stimulation, le pic d'amplitude est d'abord centré sur le 4 kHz (fréquence de meilleure sensibilité de la gerbille), puis il se décale vers le 2,5 kHz à 40 dB SPL. Au contraire, au delà de 40 dB SPL, les réponses neurales progressent plus rapidement dans les hautes fréquences. À 60 dB SPL, les réponses neurales obtenues le long de l'axe tonotopique présentent une forme bimodale avec un premier mode autour de 2,5 kHz et un second mode autour de 12,5 kHz.

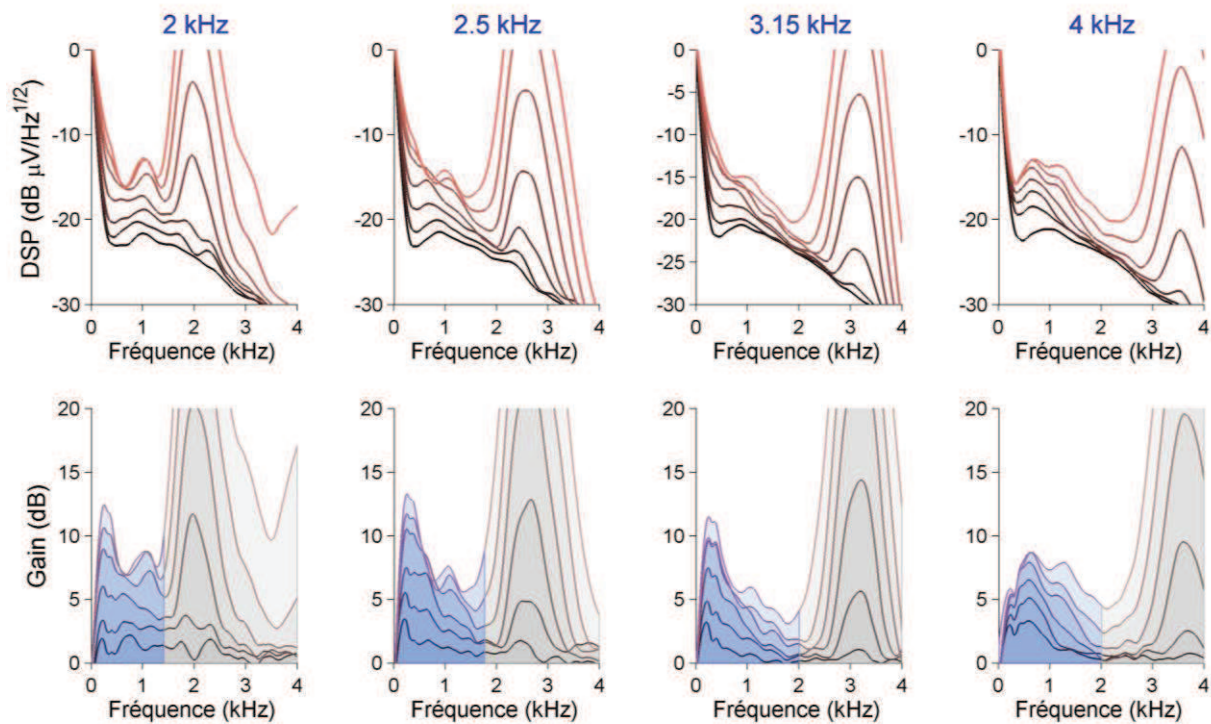


Figure 4.14: Étude des composantes fréquentielles de la réponse neurale évoquée. 1^{ère} ligne: superposition des DSP de l'activité cochléaire enregistrée pendant l'émission de bandes de bruit tiers d'octave, présentées de 0 à 60 dB SPL par pas de 10 dB (fréquence centrale de stimulation indiquée en bleu au-dessus de chaque graphique). 2^{ème} ligne: Courbes de gain d'activité obtenues en soustrayant la DSP enregistrée à 0 dB SPL aux DSP enregistrées à plus hauts niveaux de stimulation. Les composantes microphoniques, reflétant l'activité des cellules ciliées, sont représentées en gris, tandis que les composantes neurales étudiées, reflétant l'activité évoquée des fibres auditives, sont représentées en bleu. Pour les fréquences centrales de stimulation (F_c) supérieures ou égales à 3,15 kHz, les composantes neurales sont étudiées entre 0 et 2 kHz, tandis que pour les fréquences centrales de stimulation inférieures à 3,15 kHz, cette fenêtre d'étude est réduite entre 0 et $F_c/2$ afin de ne pas considérer les composantes microphoniques centrées sur F_c .

Pour interpréter ces résultats, nous avons postulé que l'évolution de la réponse neurale pouvait refléter l'activation progressive des fibres avec le niveau de stimulation. En effet, les niveaux faibles pourraient recruter sélectivement les fibres à bas seuil (c'est à dire les fibres à haute-AS), et la progression observée à plus haut niveau pourrait traduire le recrutement des fibres à plus haut seuil (c'est à dire les fibres à moyenne- et basse-AS).

Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé les données des fibres enregistrées chez des gerbilles contrôles ($n = 637$ fibres). Pour ce faire, nous avons d'abord représenté l'AS de ces fibres en fonction de leur fréquence caractéristique (**Figure 4.15B**), puis nous avons calculé la distribution cumulée des fibres à haute-, moyenne-, et basse-AS dans chaque bande d'octave (**Figure 4.15D**) pour simuler le recrutement progressif des trois classes de fibres avec le niveau de stimulation.

Les courbes obtenues reproduisent la progression des réponses neurales (**Figure 4.15C**). Ainsi, à 40 dB SPL, la distribution des réponses neurales le long de la cochlée est similaire à la distribution cumulée de l'ensemble des fibres à haute-AS (surfaces rouges, Figures 4.15C-D). En ajoutant la distribution des fibres à moyenne-AS, on retrouve des similitudes avec la progression des réponses neurales observées à 50 dB SPL (surfaces bleues, Figures 4.15C-D) et pour finir, en ajoutant la distribution des fibres à basse-AS, on retrouve l'allure des réponses neurales observées à 60 dB SPL (surfaces vertes, Figures 4.15C-D).

Ces résultats suggèrent que l'analyse de la réponse soutenue du nerf auditif, suivant la méthode présentée ici, rend bien compte de la présence des fibres à basse-AS. Étudiée le long de l'axe tonotopique, la réponse soutenue semble refléter la proportion de fibres à haute-, moyenne- et basse-AS le long de la cochlée.

Pour s'assurer que la réponse soutenue ainsi étudiée rend bien compte de l'activité des fibres à basse-AS, nous avons ensuite analysé, suivant la même technique, les réponses obtenues chez des gerbilles traitées avec 33 μ M d'oubaïne ($n=10$ gerbilles).

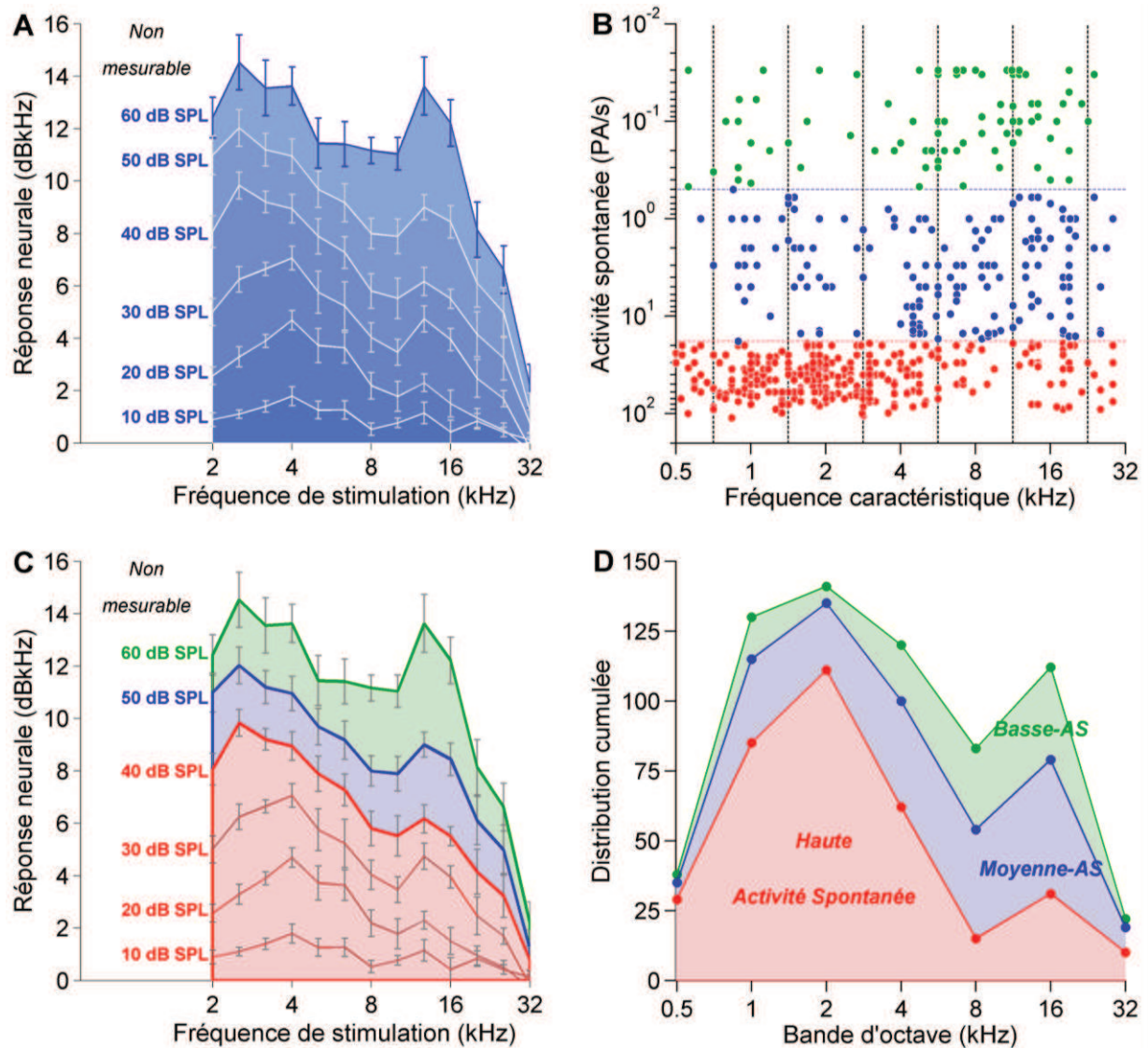


Figure 4.15: Origine de l'amplitude de la réponse neurale. **A:** Réponse soutenue des fibres du nerf auditif en fonction de la fréquence et du niveau de stimulation. Chaque courbe représente la réponse neurale obtenue à un niveau de stimulation fixe (de 10 à 60 dB SPL) pour les différentes bandes fréquentielles testées (bandes de tiers d'octave centrées de 2 à 32 kHz). Ces réponses neurales (moyenne \pm erreur standard, $n=10$ gerbilles) ont été évaluées en calculant la surface correspondant aux composantes neurales (Figure 14). **B.** Activité spontanée des fibres contrôles ($n=637$) en fonction de leur fréquence caractéristique. Les lignes pointillées verticales délimitent les bandes d'octave, et les lignes pointillées horizontales démarquent les fibres à haute (>18 PA/s; rouge), moyenne (0,5-18 PA/s; bleu) et basse (<0,5 PA/s; vert) activité spontanée. **C.** Réponse soutenue des fibres du nerf auditif en fonction de la fréquence et du niveau de stimulation (même données que dans la figure A). Les réponses obtenues à bas niveaux de stimulation (≤ 40 dB SPL) sont représentées en rouge. Tandis que les gradations obtenues à hauts niveaux de stimulation sont représentées en bleu (50 dB SPL) et en vert (60 dB SPL). **D.** Distribution cumulée des fibres par bande d'octave en allant des fibres à haute-AS vers les fibres à basse-AS.

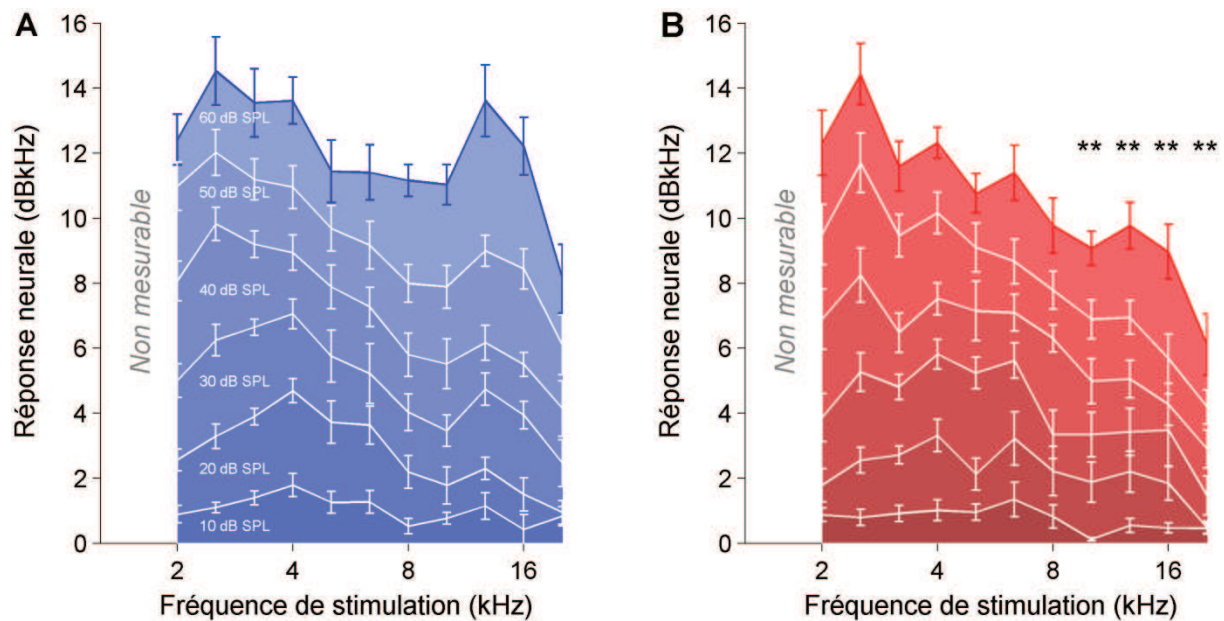


Figure 4.16: Détection de la perte de fibres le long de l'axe tonotopique. Réponse soutenue des fibres du nerf auditif en fonction de la fréquence et du niveau de stimulation pour des gerbilles contrôles (**A**, $n=10$) et des gerbilles exposées à l'ouabaïne (**B**, $n=10$). Chaque courbe correspond aux réponses neurales obtenues à un niveau de stimulation donné (de 10 à 60 dB SPL) pour les différentes bandes fréquentielles testées (bandes de tiers d'octave centrées de 2 à 20 kHz). Ces réponses neurales ont été évaluées en calculant la surface correspondant aux composantes neurales (Figure 4.14). À 60 dB SPL, la comparaison entre les valeurs obtenues chez les gerbilles contrôles (**A**, courbe bleue) et chez les gerbilles exposées à l'ouabaïne (**B**, courbe rouge) met en évidence une différence significative dans les hautes fréquences (**: $p < 0,01$ pour $F_c \geq 10$ kHz, Wilcoxon rank sum test).

Tandis qu'à 60 dB SPL, chez les gerbilles contrôles (**Figure 4.16A**, courbe bleue), la distribution des réponses neurales est bimodale; après exposition à l'ouabaïne (**Figure 4.16B**, courbe rouge), la disparition du mode centré sur 12,5 kHz ($p < 0,01$) traduit la disparition des synapses dans les hautes fréquences (**Figure 4.17**). Tandis que les réponses neurales obtenues à bas niveau de stimulation sont similaires chez les deux groupes (autour de 2 dB x kHz entre 8 et 16 kHz), la diminution des réponses obtenues à haut niveau de stimulation, chez le groupe ouabaïne, traduit la disparition des fibres à basse-AS.

Ces résultats montrent que l'analyse de la réponse soutenue du nerf auditif permet de détecter et de localiser la perte de fibres auditives. Les diminutions d'amplitude obtenues dans ce modèle de perte modérée de synapses démontrent la grande sensibilité de cette nouvelle mesure.

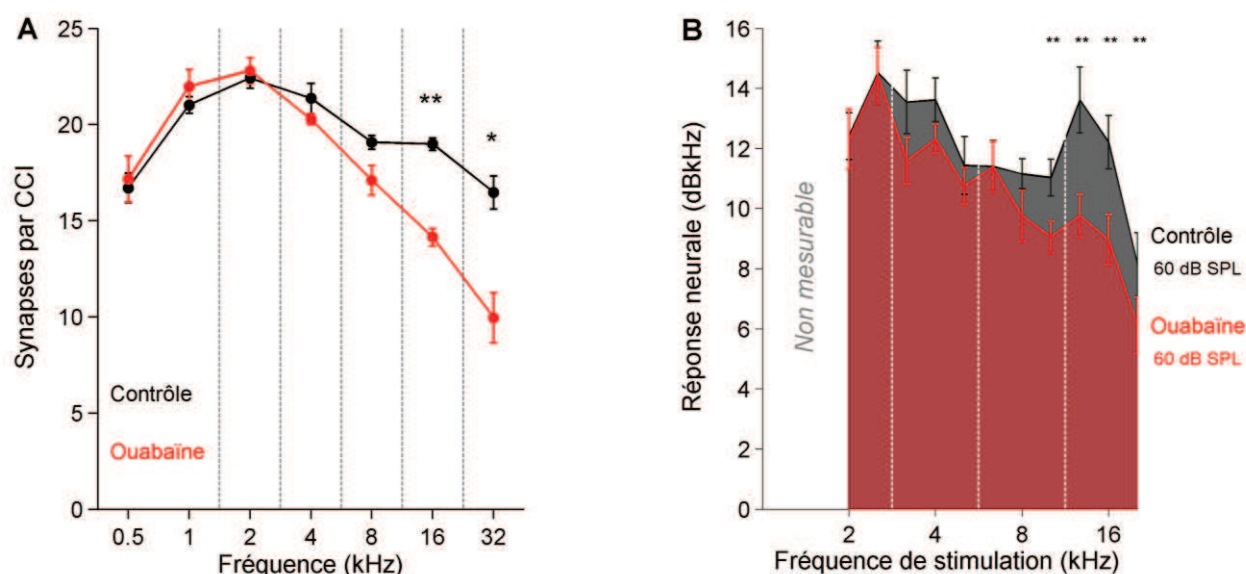


Figure 4.17: Comparaisons anatomo-fonctionnelles. **A.** Nombre moyen de synapses par CCI calculé pour chaque bande d'octave comprise entre 0,5 et 32 kHz (réplique de la Figure 4.1H). **B.** Réponses neurales obtenues à 60 dB SPL chez des gerbilles normoentendantes (noir, $n=10$) et exposées à l'ouabaïne (rouge, $n=10$). Cf. Figure 4.16.

4.3.3. Comparaison entre réponses synchrones et soutenues

Pour clore cette troisième partie et démontrer que la réponse soutenue du nerf auditif rend mieux compte de l'activité des fibres à basse-AS que le PAC, nous avons appliqué ces 2 techniques à un lot de gerbilles traitées avec 33 μ M d'ouabaïne ($n = 5$). La **Figure 4.18A** montre un exemple représentatif de PAC enregistrés à 16 kHz chez une gerbille avant (tracés noirs) et une semaine après exposition à 33 μ M d'ouabaïne (tracés rouges), pour des niveaux de stimulation allant de 20 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. Conformément aux résultats obtenus dans la première partie des résultats (section 4.2.1), l'amplitude N_1 - P_1 du PAC n'est pas affectée par la disparition des fibres à basse activité spontanée (**Figure 4.18B**, $p > 0,5$). En revanche la réponse soutenue du nerf auditif, enregistrée chez les mêmes animaux aux mêmes moments, chute d'un facteur 2 chez le groupe ouabaïne au delà de 30 dB SPL en raison de la perte des fibres à basse-AS (**Figures 4.18C-D**, $p < 0,01$). Cette analyse comparative montre clairement que la réponse soutenue du nerf auditif rend mieux compte de la perte des fibres à basse-AS que l'amplitude du PAC.

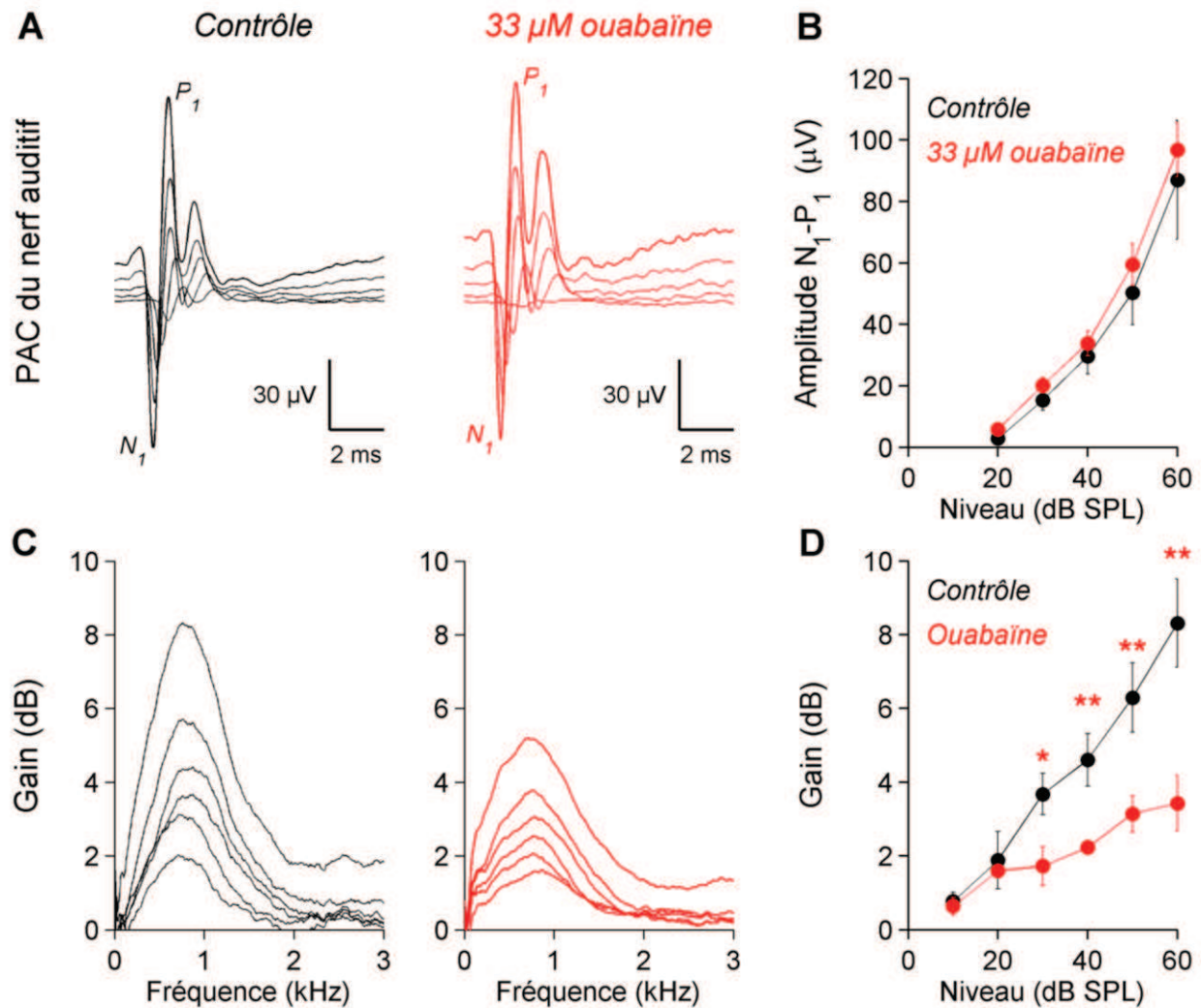


Figure 4.18: Réponses synchrones et soutenues des fibres du nerf auditif enregistrées à partir des potentiels cochléaires avant (noir) et une semaine après exposition à 33 μ M d'ouabaine (rouge). **A.** Exemple représentatif des potentiels d'action composites (PAC) du nerf auditif enregistrés chez une gerbille avant (noir) et une semaine après exposition à l'ouabaine (rouge). Ces PAC sont enregistrés en réponse à des bouffées tonales (1 ms de front de montée et de descente, 10 ms de durée, 11 bouffées/s) présentées à 16 kHz pour des niveaux de stimulation augmentant de 20 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. **B.** Quantification de l'amplitude N_1 - P_1 des PAC enregistrés à 16 kHz chez 5 gerbilles avant (noir) et une semaine après exposition à l'ouabaine (rouge). **C.** Exemple représentatif des courbes de gain d'activité obtenues à partir des réponses soutenues enregistrées chez une gerbille avant (noir) et une semaine après exposition à l'ouabaine (rouge). Ces gains d'activité sont obtenus en réponse à une bande de bruit tiers d'octave centrée sur 16 kHz et présentée pendant 20 secondes, pour des niveaux de stimulation allant de 10 à 60 dB SPL par pas de 10 dB. **D.** Quantification de l'amplitude maximale des courbes de gain d'activité obtenues à 16 kHz chez 5 gerbilles avant (noir) et une semaine après exposition à l'ouabaine (rouge). Les quantifications présentées dans cette figure (C et D) correspondent aux valeurs moyennes \pm erreurs standards obtenues chez 5 gerbilles (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ Wilcoxon rank sum test).

L'ensemble de ces résultats montre que l'analyse de la réponse soutenue du nerf auditif donne une indication du nombre et de la nature fonctionnelle (haute-, moyenne-, basse-AS)

des fibres du nerf auditif. Cette méthode présente toutefois l'inconvénient de se limiter à des fréquences de stimulation supérieures à 2 kHz pour éviter que le potentiel microphonique se superpose aux réponses neurales. Pour contourner cette limite un autre mode de stimulation pourrait être envisagé (voir discussion).

4.4. Codage temporel des fibres du nerf auditif

Dans la quatrième partie de cette thèse, nous avons développé une approche électrophysiologique qui rend compte à la fois de l'activité synchrone et soutenue des fibres du nerf auditif.

4.4.1. Protocole d'étude du codage temporel des fibres auditives

Pour observer les activités synchrone et soutenue du nerf auditif dans une même réponse, nous avons simplement recueilli les réponses cochléaires évoquées par une bande de bruit pulsée (300 ms de stimulation / 300 ms de silence) répétée une centaine de fois (**Figure 4.19**). La durée de chaque cycle de stimulation (stimulation + silence) était volontairement longue afin d'observer le temps d'adaptation du taux de décharge des fibres au début et à l'arrêt de la stimulation. Nous avons ensuite extrait la réponse neurale de la réponse cochléaire par filtrage passe-bande entre 300 et 1200 Hz. Cette procédure permettait d'éliminer les composantes extracochléaires qui sont principalement basse fréquence (< 300 Hz), et le potentiel microphonique qui était toujours, compte tenu des fréquences testées dans notre étude, au-dessus de 1200 Hz. L'enveloppe temporelle de l'activité neurale était ensuite détectée puis synchronisée pour obtenir une réponse neurale moyenne appelée Peri-Stimulus Time Response (PSTR, **Figure 4.19**) en raison de sa ressemblance avec le PSTH des fibres. En effet, cette réponse est caractérisée par une activité basale de quelques μV avant la stimulation, un pic de synchronisation en début de stimulation, une adaptation ($\tau < 100$ ms) et une activité soutenue pendant la durée de la stimulation. Une faible récupération post-stimulation est également observée après l'arrêt de la stimulation.

Cette forte similitude avec les réponses unitaires suggère que la PSTR pourrait refléter le PSTH moyen des fibres recrutées par la stimulation. Si tel est le cas, la PSTR pourrait apporter des informations essentielles sur les propriétés de codage neural des sons,

notamment chez l'homme pour lequel nous ne disposons actuellement d'aucune donnée expérimentale concernant l'activité unitaire des fibres du nerf auditif.

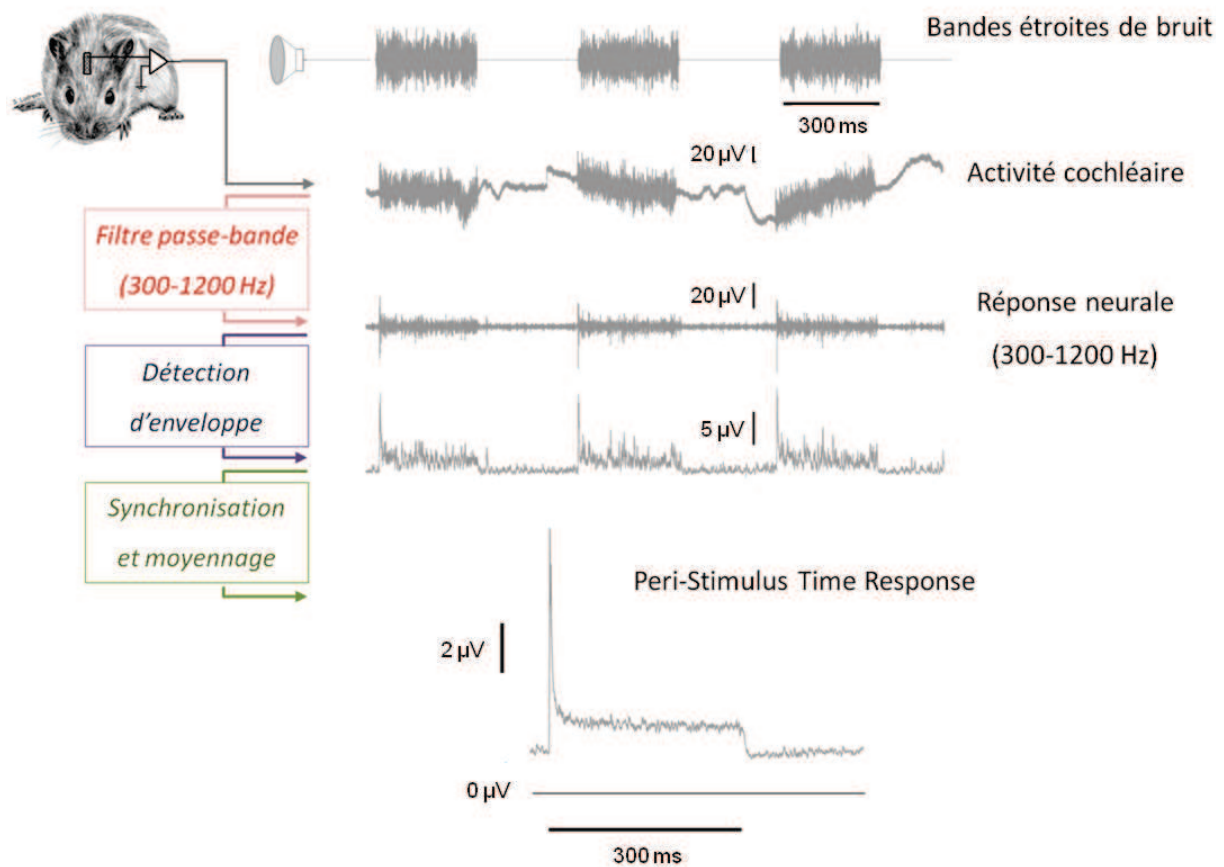


Figure 4.19 : Méthode de recueil de la PSTR. Dans cet exemple, l'activité cochléaire est enregistrée en réponse à une bande de bruit pulsée (bande de 1/3 d'octave centrée sur 4 kHz, émise à 60 dB SPL, enveloppe trapézoïdale, montée=descente=2,5 ms, durée de stimulation=intervalle inter-stimulation=300 ms, 100 répétitions). Afin d'isoler la réponse neurale, l'activité cochléaire est filtrée dans la bande fréquentielle 300-1200 Hz. La réponse neurale est ensuite redressée, lissée avec une fenêtre glissante d'1 ms, et moyennée par synchronisation avec le début de la stimulation.

4.4.2. Enregistrements simultanés PSTH/PSTR

Pour démontrer que la réponse globale reflète bien la somme des réponses unitaires des fibres, nous avons enregistré simultanément la PSTR du nerf auditif et le PSTH d'une fibre en réponse à une bande de bruit tiers d'octave centrée sur la fréquence caractéristique de la fibre (500 présentations). La **Figure 4.20** présente un exemple d'enregistrement PSTH/PSTR pour une fibre à moyenne-AS (AS=15 PA/s, FC=4756 Hz, S=10 dB SPL). Le niveau de stimulation était de 60 dB SPL. Bien que les unités d'amplitude ne soient pas les mêmes (PSTH en PA/s, PSTR en µV), le déroulement temporel des réponses est comparable

avec une activité basale avant la stimulation, un pic de synchronisation en début de stimulation, une adaptation et une activité soutenue. Après l'arrêt de la stimulation, la récupération post-stimulation est très nette en unitaire, tandis qu'elle est plus difficile à percevoir au niveau de la réponse globale. Cette faible récupération de la PSTR pourrait s'expliquer par le petit nombre de fibres engagées dans la réponse, relativement au nombre total de fibres contribuant à l'activité cochléaire spontanée.

Il est aussi intéressant d'observer que la forme de la PSTR est beaucoup plus lisse que celle de la PSTH qui est par définition soumise à une variance statistique liée à la valeur du pas temporel de l'histogramme (1 ms dans cet exemple). La résolution temporelle de la PSTR (50 μ s) est aussi bien supérieure à celle du PSTH (1 ms) ce qui offre un avantage intéressant pour évaluer précisément des constantes de temps d'adaptation. Pour cet exemple, le rapport pic-sur-plateau est quasi identique pour les deux réponses (PSTH : $525/100=5,25$; PSTR : $25.5/5=5,1$).

4.4.3. Effet du niveau de stimulation

Pour aller plus loin dans la comparaison PSTH/PSTR, nous avons testé différents niveaux de stimulation. La **Figure 4.21** présente les réponses unitaires (PSTH, **Figure 4.21A**) et globales (PSTR, **Figure 4.21C**) enregistrées simultanément en réponse à une stimulation centrée sur la fréquence caractéristique de la fibre, et présentée de 0 à 50 dB SPL par pas de 10 dB. À 10 dB SPL, le PSTH laisse apparaître une légère augmentation d'activité pendant la durée de la stimulation, sans pic de synchronisation (**Figure 4.21A**). À 20 dB SPL, un pic de synchronisation et une période d'adaptation apparaissent en début de stimulation, tandis qu'une diminution de l'activité basale de la fibre est observée après l'arrêt de la stimulation. À 30 dB SPL, le pic de synchronisation, l'activité soutenue, et le temps de récupération de la fibre augmentent. La phase d'adaptation observée en début de stimulation met alors en évidence une décroissance exponentielle rapide du taux de décharge. Au-delà, seuls le pic de synchronisation et le temps d'adaptation qui s'en suit semblent évoluer avec le niveau de stimulation.

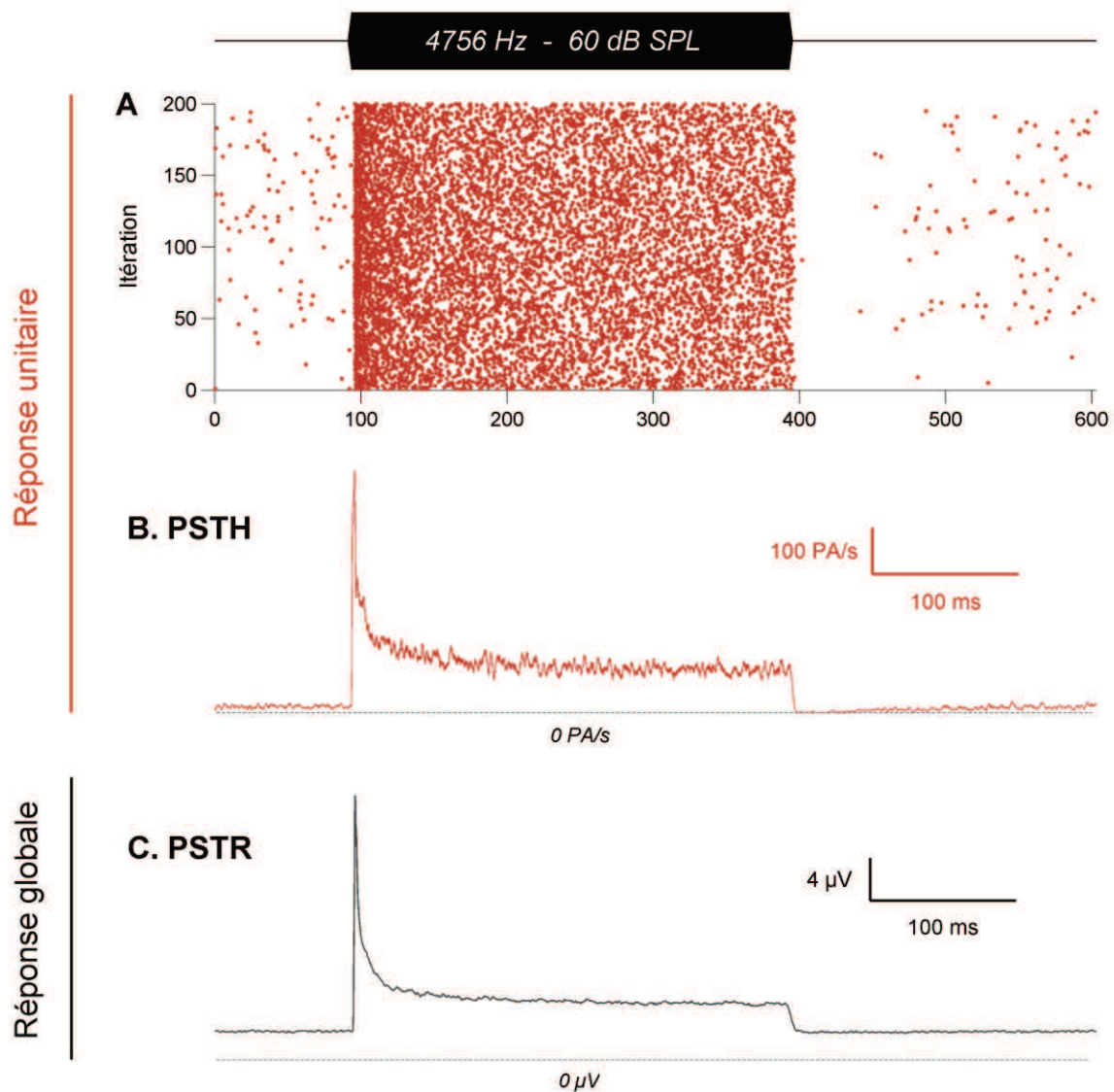


Figure 4.20 : Enregistrement simultané de la réponse unitaire d'une fibre et de la PSTR. Les réponses unitaires d'une fibre auditive (rouge) et la PSTR extraite à partir des potentiels cochléaires (noir) sont enregistrées simultanément en réponse à une bande de bruit tiers d'octave (montée=descente=2,5 ms, durée=300 ms, intervalle-inter stimulation=300 ms, 500 présentations) centrée sur la fréquence caractéristique de la fibre (FC=4756 Hz) et présentée à 60 dB SPL. **A:** Les points rouges représentent les instants de détection des potentiels d'action émis par la fibre lors des 200 premières itérations de la stimulation. Les potentiels d'action détectés avant le début de chaque stimulation mettent en évidence le niveau d'activité basale de la fibre, proche de son niveau d'activité spontanée (AS=15 PA/s). **B:** L'histogramme temporel de décharge de la fibre (PSTH: *Peri-Stimulus Time Histogram*) est construit à partir des PA détectés au cours des 500 présentations de la stimulation, avec un pas temporel égal à 1 ms. La ligne pointillée horizontale représente le taux de décharge égal à 0 PA/s. **C:** La réponse temporelle enregistrée simultanément à partir des potentiels cochléaires (PSTR: *Peri-Stimulus Time Response*) est représentée en noir. Elle est lissée avec une fenêtre d'1 ms (même pas temporel que pour la construction du PSTH). La ligne pointillée horizontale représente l'amplitude égale à 0 μV.

Pour ce qui est des PSTR (**Figure 4.21C**), une réponse commence à émerger de la ligne de base à partir de 20 dB SPL. Comme la réponse unitaire enregistrée simultanément, la PSTR présente aussi un petit pic de synchronisation, suivi d'une adaptation et d'une activité soutenue maintenue pendant la durée de la stimulation. Le pic de synchronisation de la PSTR progresse ensuite très rapidement avec le niveau de stimulation tandis que l'évolution de l'activité soutenue est moins marquée.

Pour étudier plus précisément le dérours temporel de ces réponses, nous les avons analysées à l'aide du modèle d'ajustement à double exponentielle plus une constante proposé par (Westerman and Smith, 1984) pour l'étude de réponses unitaires (**Figure 4.22A**). Dans la **Figure 4.21B** nous avons superposé les PSTH et leur modèle d'ajustement (noir). Au seuil de réponse de la fibre (10 dB SPL), la qualité de l'ajustement est médiocre car l'amplitude de la réponse est faible et ne présente pas de pic de synchronisation ($R^2 = 0,05$). Au-delà de 20 dB SPL, la qualité de l'ajustement s'améliore en raison de l'apparition du pic de synchronisation et de l'adaptation qui s'en suit ($R^2 \geq 0,53$). La **Figure 4.21D** représente les PSTR et leur modèle d'ajustement (rouge). Comme pour l'unitaire, la qualité de l'ajustement devient satisfaisante au-delà de 20 dB SPL.

Ces données montrent que pour des niveaux supraliminaires, le dérours temporel de la PSTR est caractérisé par une adaptation rapide, une adaptation lente, puis un plateau, comme le dérours temporel des PSTH obtenus à partir des enregistrements unitaires (Westerman and Smith, 1984).

Les paramètres d'amplitude et de temps du modèle d'ajustement ont été affichés en fonction du niveau de stimulation (**Figure 4.22 B-E**). Pour les PSTH, les amplitudes des 3 composantes (rapide : A_R , lente : A_{ST} , et continue : A_{SS}) augmentent avec le niveau de stimulation, cependant la composante rapide (A_R , en orange) progresse plus rapidement que les autres, avec un taux de décharge qui passe de 60 à 500 PA/s entre 20 et 60 dB SPL (**Figure 4.22B**). A l'opposé, les constantes de temps rapides (τ_R) et lentes (τ_{SL}) diminuent avec le niveau de stimulation, avec un effet plus marqué pour la constante de temps rapide (τ_R , orange) qui passe de 5 à 0,5 ms de 20 à 60 dB SPL (**Figure 4.22C**). Ces résultats sont en accord avec les données unitaires décrites dans (Westerman and Smith, 1984).

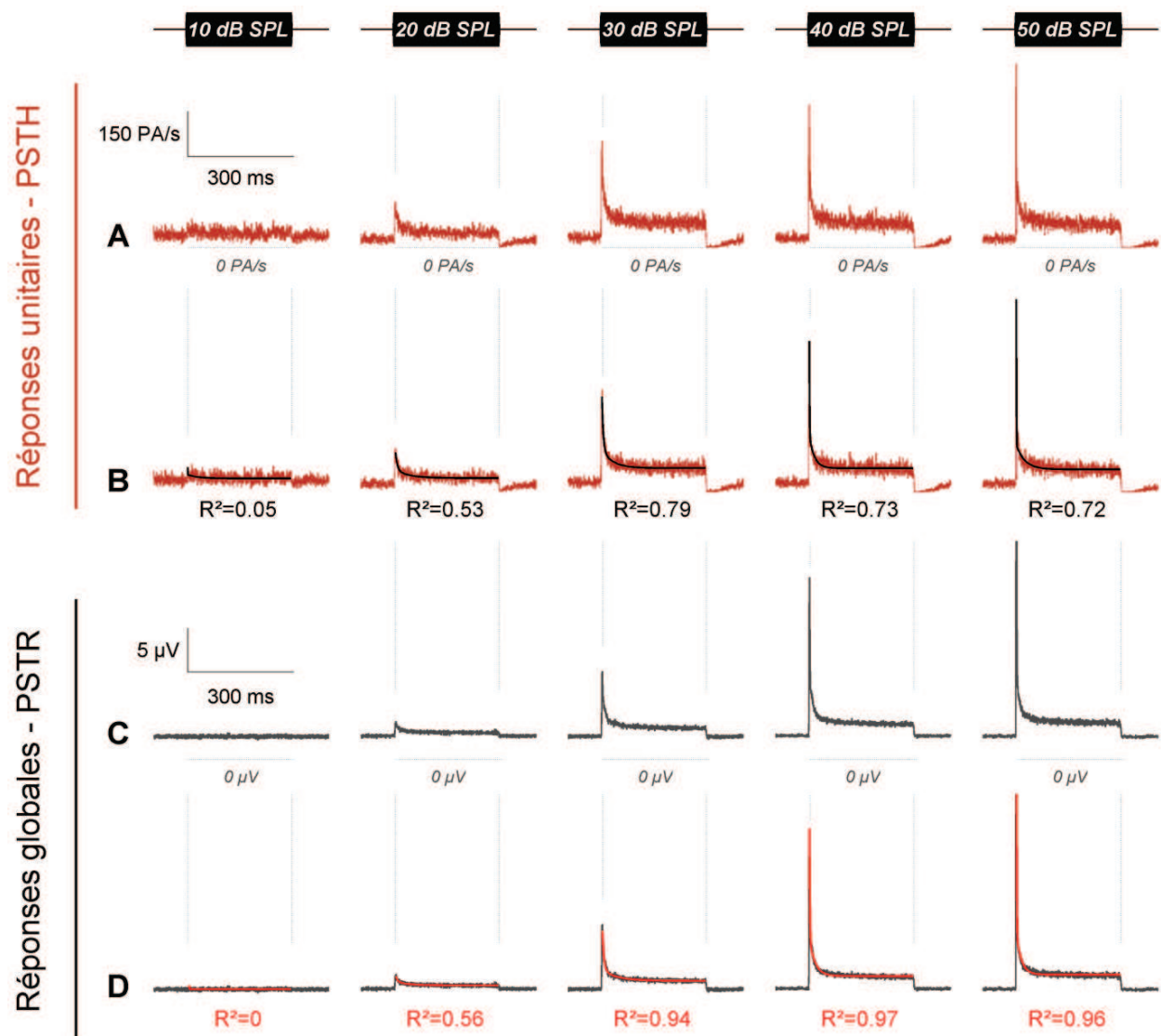


Figure 4.21 : Enregistrements simultanés PSTH/PSTR pour différents niveaux de stimulation. A et B. Histogrammes temporels de décharge de la fibre (FC=2996 Hz, AS=45 PA/s, Seuil=10 dB SPL) enregistrée en réponse à des bandes de bruit tiers d'octave (montée=descente=2,5 ms, durée=300 ms, intervalle-inter stimulation=300 ms, 500 présentations) centrées sur la fréquence caractéristique de la fibre et présentées de 10 à 50 dB SPL par pas de 10 dB. Les PSTH sont construits avec un pas temporel égal à 1 ms. En B, la courbe noire superposée sur chaque tracé représente la courbe d'ajustement du modèle proposé par (Westerman and Smith, 1984) pour l'analyse des PSTH chez la gerbille. L'adéquation entre le modèle de d'ajustement et chaque PSTH est traduite par le coefficient de détermination R^2 indiqué en noir sous chaque. **C et D.** PSTR enregistrées simultanément. En D, la courbe rouge superposée sur chaque tracé représente le modèle d'ajustement, proposé initialement par (Westerman and Smith, 1984) pour l'analyse des PSTH, et adapté ici à l'ajustement des PSTR. Le coefficient de détermination R^2 est indiqué sous chaque réponse en rouge.

Pour les PSTR, l'évolution des paramètres du modèle suit le même comportement qu'en unitaire, à savoir une augmentation des amplitudes avec le niveau (surtout A_R qui passe de 0,6 à 40 μV de 20 à 60 dB SPL, **Figure 4.22D**) et une diminution des constantes de temps avec le niveau (surtout τ_R qui passe de 5,4 à 0,5 ms comme en unitaire, **Figure 4.22E**).

Cette étude préliminaire suggère que l'analyse du décours temporel des PSTR apporte les mêmes informations que l'analyse du décours temporel des PSTH sur l'état fonctionnel des fibres.

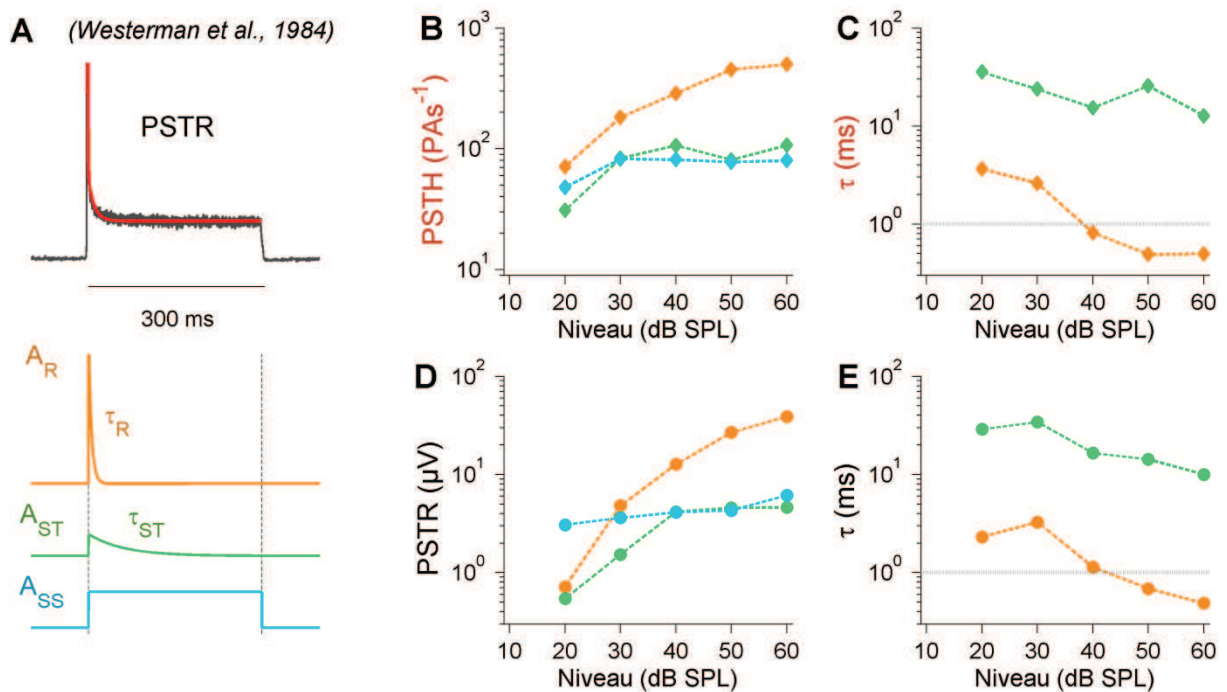


Figure 4.22 : Etude des composantes des réponses temporelles (PSTH et PSTR) enregistrées simultanément pour différents niveaux de stimulation. Ces mesures correspondent aux réponses présentées dans la Figure 25. **A** : Modèle d'ajustement proposé initialement par (Westerman and Smith, 1984) pour l'analyse des PSTH, également adapté ici à l'ajustement des PSTR. Ce modèle est constitué de deux composantes exponentielles décroissantes et d'une composante continue. Les paramètres de la composante décroissante rapide sont représentés en orange (A_R (μV) et τ_R (ms)), ceux de la composante décroissante lente sont représentés en vert (A_{ST} (μV) et τ_{ST} (ms)) et l'amplitude de la composante continue (A_{SS} (μV)) est représentée en bleu. **B et D** : Amplitudes des composantes du modèle d'ajustement en fonction du niveau de stimulation, pour les PSTH (B) et les PSTR (D) enregistrés simultanément. **C et E** : Constantes de temps des composantes exponentielles du modèle d'ajustement en fonction du niveau de stimulation pour les PSTH (C) et les PSTR (E) enregistrés simultanément.

Pour aller plus loin dans la description de la réponse globale, nous avons analysé les PSTR enregistrées chez 10 gerbilles contrôles, pour un niveau de stimulation progressant de 0 à 80 dB SPL, et une fréquence de stimulation centrée sur le 4 kHz (fréquence de meilleure sensibilité chez la gerbille).

La **Figure 4.23A** présente les PSTR (en noir) obtenues chez un animal représentatif ainsi que leur modèle d'ajustement (en rouge). Le seuil d'apparition de la PSTR se situe à 10 dB SPL. Comme évoqué dans l'exemple précédent (Figure 21D), la réponse se grade avec le niveau de stimulation. La **Figure 4.23B** montre que la qualité d'ajustement moyenne devient satisfaisante ($R^2 > 0,5$) à partir de 20 dB SPL. Nous avons ensuite superposé dans la **Figure 4.23C** l'amplitude moyenne des composantes rapide (orange), lente (vert) et soutenue (bleu) avec l'amplitude du pic de synchronisation (noir) lorsque qu'il est simplement mesuré sur la PSTR. Cette comparaison est intéressante car la définition du modèle implique que l'amplitude du pic vaut la somme des amplitudes des 3 composantes du modèle ($A_{PIC} = A_R + A_{ST} + A_{SS}$). Cette représentation nous permet donc d'étudier la contribution des 3 composantes à la réponse synchrone de la PSTR. Deux gammes de réponses se distinguent suivant le niveau de stimulation. De 20 à 60 dB SPL, c'est principalement la composante rapide qui détermine l'amplitude du pic de synchronisation car elle est beaucoup plus ample que les composantes lente et soutenue (qui d'ailleurs se superposent quasiment, **Figure 4.23C**). Par contre, au-dessus de 60 dB SPL, la composante rapide sature et c'est alors la composante continue en bleu qui croît soudainement (**Figure 4.23C**) comme le montrait déjà l'exemple représentatif de la Figure 4.23A.

La **Figure 4.23D** représente les constantes de temps rapide (orange) et lente (verte) du modèle d'ajustement. Cette figure montre tout d'abord que la constante de temps lente (verte, ~ 60 ms en moyenne) varie très peu avec le niveau en accord avec nos données unitaires (traces pointillées, $n = 4$ fibres de FC proche de 4 kHz) et celles de (Westerman and Smith, 1984). Par contre les constantes de temps rapides des PSTR (orange foncé) et des PSTH (orange pâle) diminuent fortement de 20 à 60 dB SPL (de $4,67 \pm 0,4$ ms à $2,4 \pm 0,2$ ms pour les PSTR et de $5,8 \pm 0,6$ ms à $1,6 \pm 0,6$ ms pour les PSTH, $p < 0,01$). Au-delà de 60 dB SPL, la constante de temps rapide de la PSTR augmente.

A Exemple représentatif

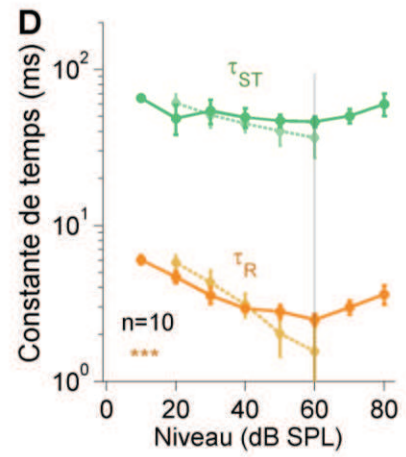
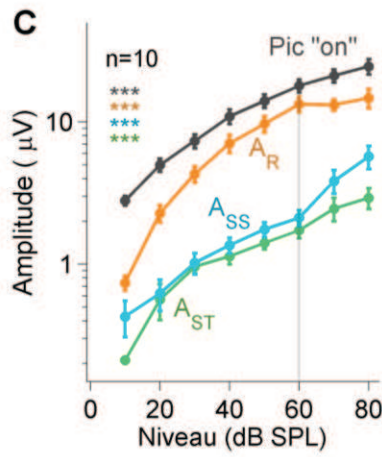
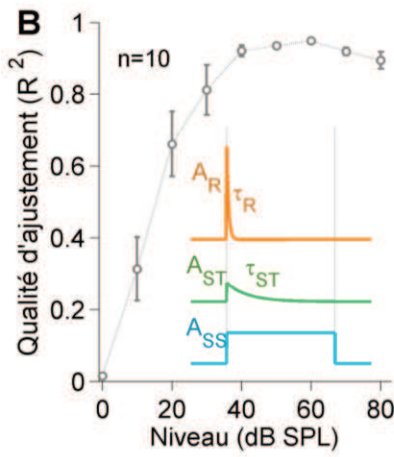
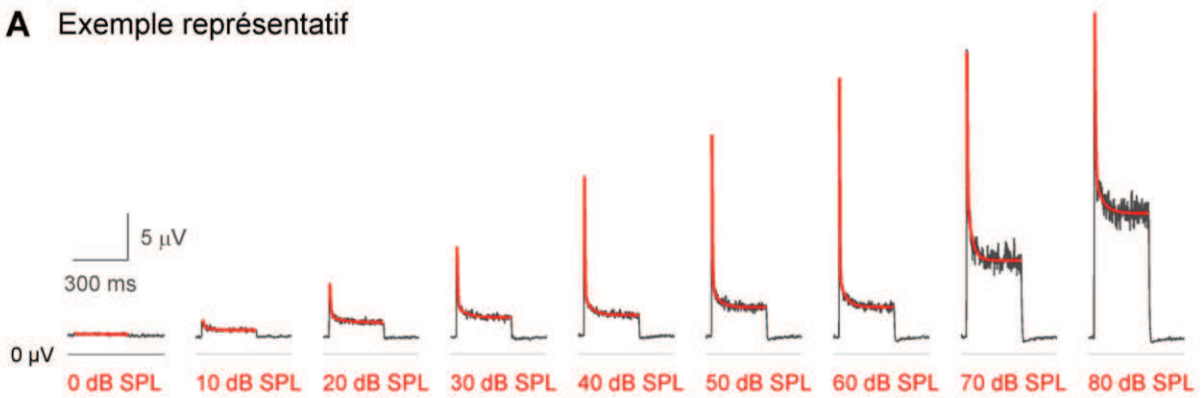


Figure 4.22 : Effet du niveau de stimulation sur les paramètres de la PSTR. **A.** Exemple représentatif des PSTR enregistrées chez une gerbille en réponse à des bandes de bruit tiers d'octave centrées sur 4 kHz et présentées de 0 à 80 dB SPL. La courbe rouge superposée sur chaque tracé représente la courbe d'ajustement du modèle proposé par (Westerman and Smith, 1984). **B.** Au cœur de ce graphique sont représentées les 3 composantes du modèle d'ajustement. La qualité d'ajustement en fonction du niveau de stimulation est représentée par le coefficient de détermination R^2 (moyenne \pm erreur standard, $n=10$). **C.** Moyennes et erreurs standard à la moyenne ($n=10$) de l'amplitude du pic de la PSTR lissée (courbe noire) et des amplitudes des composantes du modèle d'ajustement (courbes colorées) pour chaque niveau de stimulation. **D.** Moyennes et erreurs standard à la moyenne ($n=10$) des constantes de temps (ms) de la composante exponentielle rapide τ_R et de la composante exponentielle lente τ_{ST} pour chaque niveau de stimulation. Les constantes de temps évaluées à partir des PSTH obtenus dans les mêmes conditions de stimulation sont représentées avec des couleurs pâles ($n=4$). De 10 à 80 dB SPL, le niveau de stimulation a un effet significatif sur tous les paramètres étudiés (Anova à un facteur et procédure de comparaisons multiples, ***: $p < 0,001$), hormis la constante de temps de la composante exponentielle lente (τ_{ST} , $p > 0,05$).

Pour expliquer ces résultats, nous avons créé les 3 schémas présentés dans la **Figure 4.23**. Au seuil d'apparition de la PSTR (**Figure 4.23A**), seules les fibres les plus sensibles de la bande fréquentielle testée (bande 1/3 d'octave soit $\sim 500 \mu\text{m}$ d'après (Muller, 1996)) élèvent leur taux de décharge. La PSTR enregistrée est alors de faible amplitude, avec un faible rapport pic-sur-plateau. Entre 20 et 60 dB SPL, la stimulation recrute plus de fibres et de façon plus synchrone mais en restant sélective en fréquence (**Figure 4.23B**). Le rapport pic-sur-plateau de la PSTR augmente alors de façon importante jusqu'à atteindre une valeur maximale à 60 dB SPL. L'augmentation soudaine de l'activité soutenue au-dessus de 60 dB SPL pourrait s'expliquer par une perte de sélectivité en fréquence de la stimulation à haut niveau de stimulation (Robles and Ruggero, 2001), entraînant un recrutement massif des fibres de la base de la cochlée (**Figure 4.23C**). La perte de synchronisation induite par cette perte de sélectivité fréquentielle justifie la saturation de la composante rapide et l'augmentation de sa constante de temps.

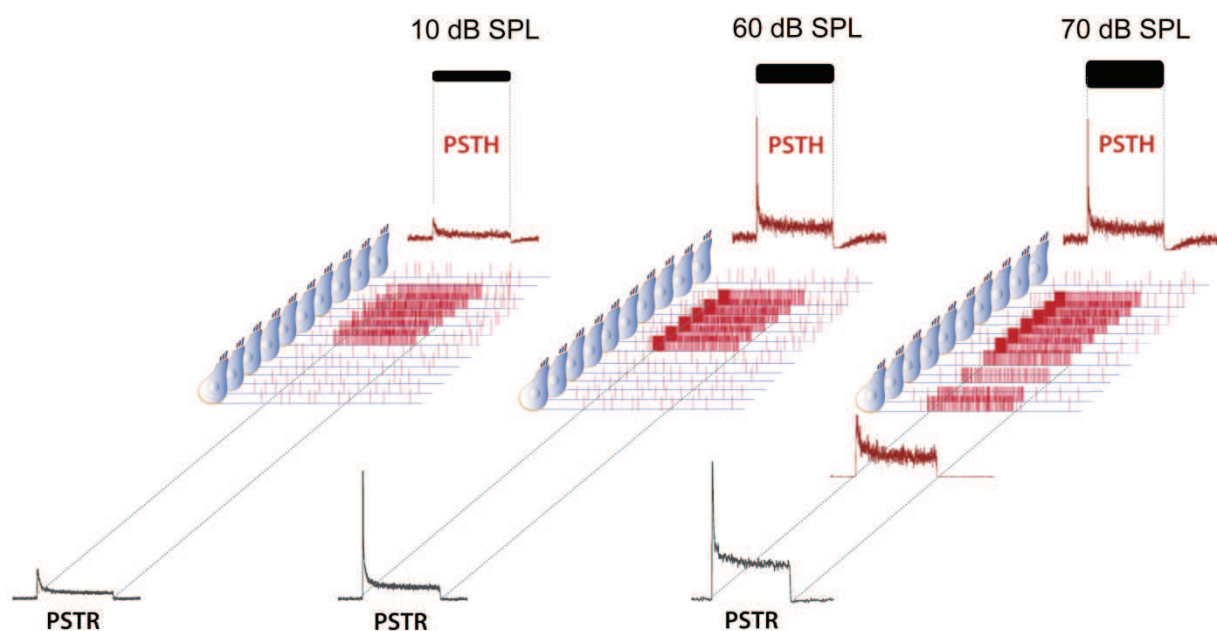


Figure 4.23: Illustration correspondant à l'effet du niveau de stimulation sur la PSTR (Figure 4.22). Jusqu'à 60 dB SPL la stimulation est sélective en fréquence et le déroulement temporel de la PSTR reflète le déroulement temporel des PSTH des fibres recrutées par la stimulation. À 60 dB SPL, la meilleure synchronisation des réponses en début de stimulation se traduit par une forte augmentation du pic de synchronisation et par la diminution de la constante de temps rapide de l'adaptation (Figure 4.22). Au delà de 60 dB SPL, la stimulation n'est plus sélective en fréquence. Le recrutement des fibres de la base se traduit au niveau de la PSTR par l'augmentation de sa réponse soutenue et de sa constante de temps rapide d'adaptation (Figure 4.22).

Ces résultats suggèrent que pour des niveaux de stimulation n'entraînant pas de recrutement cochléaire (niveau ≤ 60 dB SPL), la PSTR reflète le taux de décharge des fibres recrutées par la stimulation. Il est donc raisonnable de postuler que la PSTR représente le PSTH moyen des fibres recrutées par la stimulation.

4.4.4. Effet de la fréquence centrale de stimulation

Pour démontrer que la PSTR représente le PSTH moyen des fibres recrutées par la stimulation, nous avons mené une expérience simple chez des gerbilles contrôles. Sachant que la proportion de fibres à haute-AS n'est pas homogène le long de la cochlée de gerbille (74% des fibres ont une haute-AS au-dessous de 4 kHz contre 28% au-dessus, voir Figure 2), nous avons enregistré la PSTR pour des stimulations centrées sur des fréquences comprises entre 2,5 et 16 kHz et présentées à un niveau acoustique de 50 dB SPL. Si notre hypothèse de travail est correcte, le pic de synchronisation des PSTR devrait être significativement plus ample pour des basses fréquences plutôt que pour des hautes fréquences de stimulation (voir enregistrements simultanés et schéma explicatif dans la **Figure 4.24**).

Les résultats présentés dans la **Figure 4.25** vérifient notre hypothèse. L'exemple représentatif de PSTR obtenue pour toutes les fréquences testées (**Figure 4.25A**) montre que l'amplitude du pic de synchronisation chute brutalement au-dessus de 6,3 kHz ce qui correspond exactement au changement de composition du nerf chez la gerbille (voir Figure 2). Pour isoler les composantes rapide, lente et soutenue de la PSTR, nous avons appliqué le modèle d'ajustement aux PSTR (**Figure 4.25A,B**). Cette analyse montre clairement que l'amplitude du pic (**Figure 4.25C**, courbe noire) perd $\sim 40\%$ de son amplitude entre 2,5 ($12,8 \pm 1 \mu\text{V}$) et 16 kHz ($7,3 \pm 0,5 \mu\text{V}$, $p < 0,001$). L'analyse plus détaillée des trois composantes montre que c'est surtout la composante rapide (**Figure 4.25C**, courbe orange) qui décroît entre 2,5 ($7,7 \pm 0,9 \mu\text{V}$) et 12,5 kHz ($2,4 \pm 0,3 \mu\text{V}$, $p < 0,001$), avec une réduction de $\sim 70\%$ de son amplitude. Ce résultat est logique car la composante rapide reflète la synchronisation du premier potentiel d'action évoqué par la stimulation (Figure 4.7D).

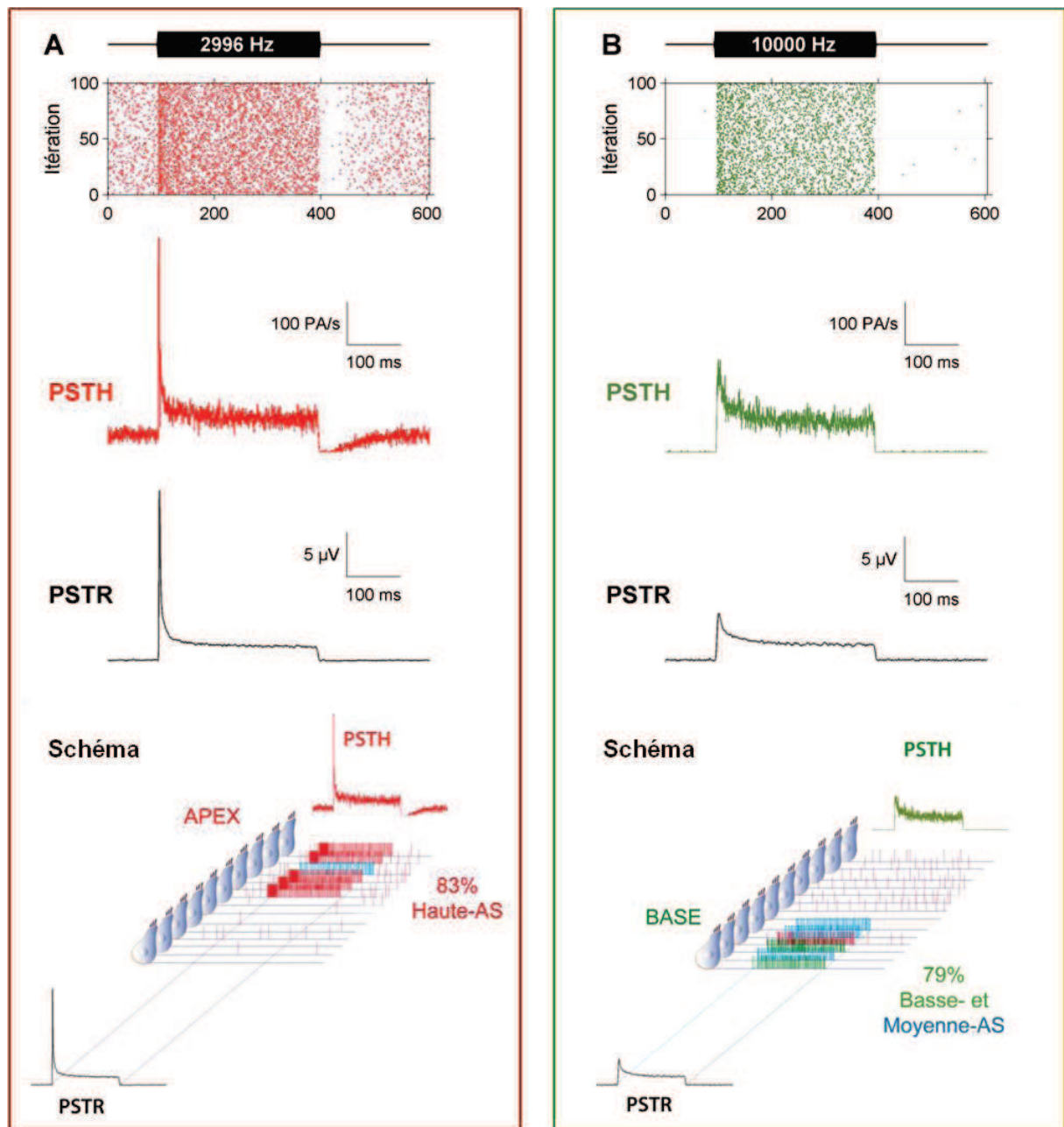


Figure 4.24 : Enregistrements simultanés pour une basse et une haute fréquence de stimulation. Les réponses unitaires d'une fibre (couleur) et la PSTH (noir) sont enregistrées simultanément en réponse à une bande de bruit tiers d'octave (50 dB SPL, montée=descente=2,5 ms, durée=300 ms, intervalle-inter stimulation=300 ms, 500 présentations) centrée sur la FC de la fibre (**A**. FC=2996 Hz - AS=45 PA/s ; **B**. FC=10000 Hz - AS=0,33 PA/s). *Nuages de points*: instants de détection des PA émis par la fibre lors des 100 premières itérations de la stimulation. **PSTH**: Histogrammes temporels de décharge construits à partir des PA détectés au cours des 500 présentations de la stimulation (pas temporel: 1 ms). **PSTR**: Réponse extraite des potentiels cochléaires. **Schéma**: Schémas réalisés à partir des réponses obtenues lors des enregistrements simultanés. Ces réponses suggèrent que pour des basses fréquences de stimulation (**A**), le grand pic de la PSTR reflète la bonne synchronisation des fibres à haute-AS (83% des fibres enregistrées pour $2 \text{ kHz} \leq \text{FC} < 4 \text{ kHz}$) ; tandis que pour des hautes fréquences de stimulation (**B**), le petit pic de la PSTR reflète la faible synchronisation des fibres à basse- et à moyenne-AS (79% des fibres enregistrées pour $8 \text{ kHz} \leq \text{FC} < 16 \text{ kHz}$).

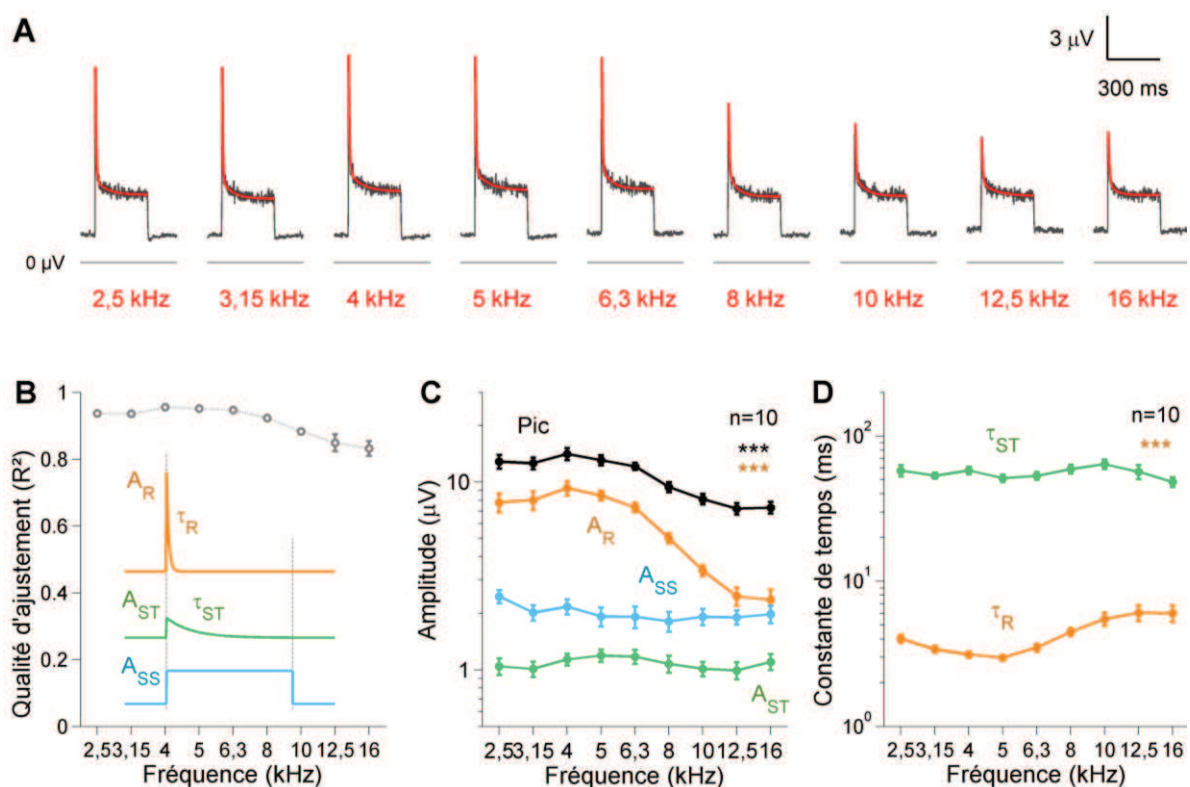


Figure 4.25 : Effet de la fréquence de stimulation sur la PSTR. **A.** Exemple représentatif des PSTR enregistrées chez une gerbille en réponse à des bandes de bruit tiers d'octave présentées à 50 dB SPL pour des fréquences centrales de stimulation augmentant de 2,5 à 16 kHz. La courbe rouge superposée sur chaque tracé représente la courbe d'ajustement du modèle proposé par (Westerman and Smith, 1984). **B.** Au cœur de ce graphique sont représentées les 3 composantes du modèle d'ajustement. La qualité d'ajustement en fonction de la fréquence de stimulation est représentée par le coefficient de détermination R^2 (moyenne \pm erreur standard, $n=10$). **C.** Moyennes et erreurs standard à la moyenne ($n=10$) de l'amplitude du pic de la PSTR lissée (blanc) et des amplitudes des composantes du modèle d'ajustement (couleurs) pour chaque fréquence centrale de stimulation. **D.** Moyennes et erreurs standard à la moyenne ($n=10$) des constantes de temps de la composante rapide et de la composante lente pour chaque fréquence centrale de stimulation. La fréquence de stimulation a un effet significatif sur l'amplitude du pic de la PSTR et sur les paramètres de la composante rapide (Anova à un facteur et procédure de comparaisons multiples, ***: $p < 0,001$).

L'analyse de la constante de temps rapide confirme également ce résultat (**Figure 4.25D**). En effet, lorsque la stimulation recrute les fibres de l'apex ($FC \leq 4$ kHz), composées majoritairement de fibres à haute-AS, cette constante de temps est rapide ($4 \pm 0,2$ ms à 4 kHz) car ces fibres sont bien synchronisées (Figure 4.7A-B). En revanche, lorsque la stimulation recrute les fibres de la base, composées surtout de fibres à basse- et moyenne-AS, cette constante de temps augmente ($6 \pm 0,8$ ms à 12,5 kHz, $p < 0,001$) car ces fibres sont moins bien synchronisées en début de stimulation. Il est intéressant d'observer que les composantes lente et soutenue semblent indépendantes de la composition du nerf, ce qui

suggère que les mécanismes physiologiques à l'origine de ces composantes (libération vésiculaire lente et soutenue, (Moser and Beutner, 2000) sont probablement indépendants de la fréquence caractéristique et de l'activité spontanée des fibres.

4.4.5. Comparaisons inter-espèces

Pour motiver le futur développement clinique de la PSTR, nous avons souhaité montrer préalablement que cette réponse était observable chez les 4 modèles animaux utilisés dans notre laboratoire (**Figure 4.26**). Pour tous ces enregistrements, l'électrode de recueil était positionnée dans la niche de la fenêtre ronde. La stimulation acoustique était présentée à 50 dB SPL et centrée sur la fréquence de meilleure sensibilité du modèle animal utilisé (gerbille : 4 kHz, cochon d'Indes : 8 kHz ; rat : 8 kHz, souris : 12,5 kHz). Les PSTR de cochon d'inde et de gerbille sont comparables à la fois en amplitude et en cinétique avec un rapport pic-sur-plateau proche de 3. Ce ratio important suggère que le nombre de fibres à haute-AS chez le cochon d'inde est important dans la zone cochléaire testée, ce qui est effectivement le cas (Tsuji and Liberman, 1997). Chez le rat et la souris, les réponses sont également comparables deux à deux avec un faible rapport pic-sur-plateau (<2) suggérant une faible proportion de fibres à haute activité spontanée, comme c'est effectivement le cas pour ces deux rongeurs (Taberner and Liberman, 2005). Appliquée à l'homme, à l'aide d'enregistrements trans-tympaniques par exemple, cette méthode pourrait permettre d'évaluer la composition du nerf auditif.

Les résultats présentés dans cette dernière partie montrent que l'analyse du décours temporel de la PSTR pourrait permettre d'étudier, comme la technique de l'enregistrement unitaire, les propriétés fonctionnelles des fibres du nerf auditif. Cette méthode présente 3 avantages importants par rapport à la technique de l'enregistrement unitaire : 1) compte tenu de son caractère moins invasif, elle est applicable à l'homme, 2) elle permet d'étudier l'activité d'une population ciblée (contrairement à l'unitaire qui par définition ne concerne qu'une fibre détectée de façon aléatoire), et 3) elle permet de faire une étude tonotopique des réponses neurales.

La composante rapide de la PSTR, reflétant la synchronisation des décharges évoquées en début de stimulation, pourrait nous donner des indications sur la fusion du contingent de vésicules synaptiques ancrées à la membrane (Readily Releasable Pool -

RRP (Moser and Beutner, 2000)). La composante soutenue de cette réponse pourrait quant à elle refléter la fusion vésiculaire soutenue liée au réapprovisionnement des vésicules aux zones actives (slowly releasable pool - SRP). Ainsi, à travers la PSTR, l'étude des réponses temporelles des fibres auditives pourrait faciliter le dépistage et l'identification des synaptopathies (Moser et al., 2013).

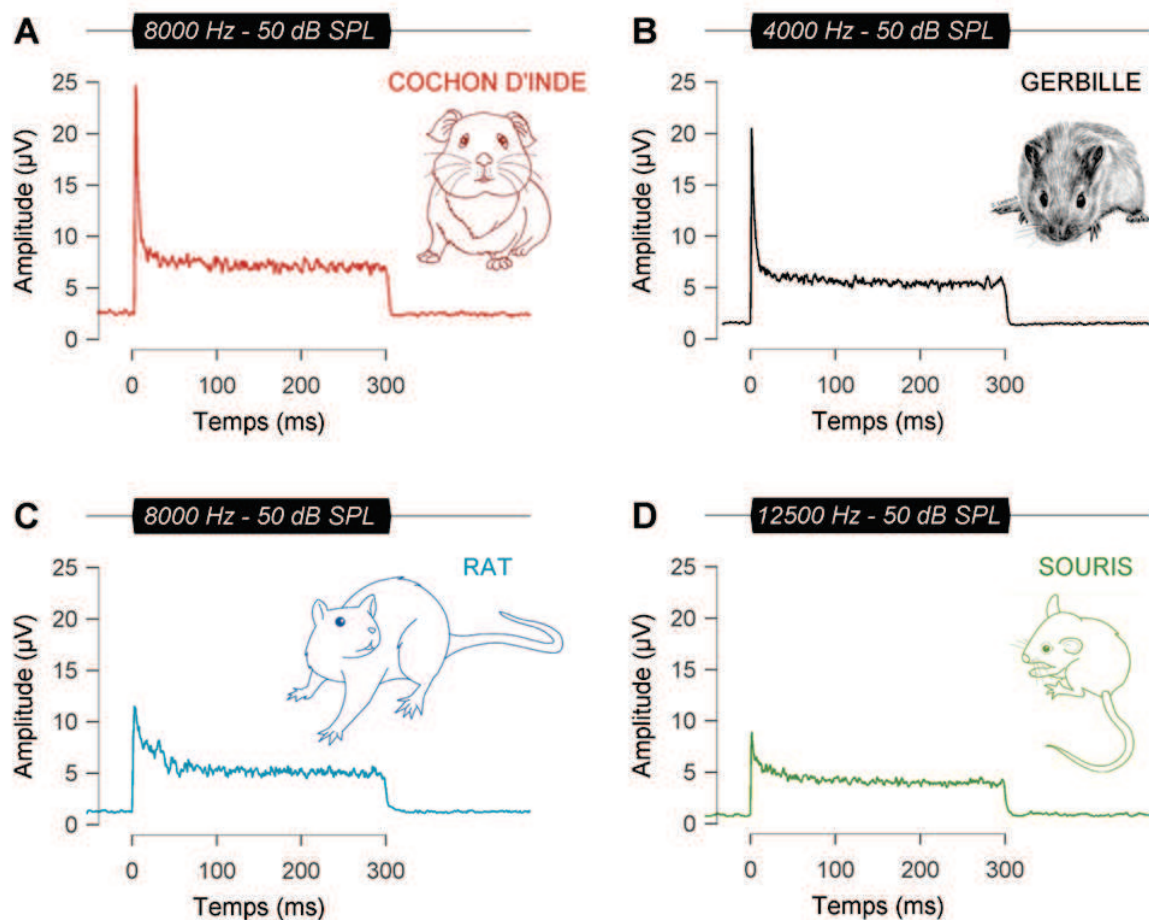


Figure 4.26 : Exemple de PSTR chez le rongeur (cochon d'inde, gerbille, rat, souris). Les PSTR ont été obtenues en réponse à une bande de bruit pulsée (largeur de bande : 1/3 d'octave, enveloppe trapézoïdale, montée=descente= 2,5 ms, 300 ms stimulation, 300 ms de silence, 100 présentations) centrée sur la fréquence de meilleure sensibilité du modèle animal utilisé

5. DISCUSSION

Le potentiel d'action composite du nerf auditif reflète l'activation synchrone des fibres du nerf auditif en réponse à une stimulation sonore (Goldstein and Kiang, 1958). Il est généralement admis que l'ensemble des fibres du nerf auditif contribuent au PAC. Les niveaux sonores liminaires activent préférentiellement les fibres à haute-AS qui disposent d'un seuil d'activation bas, alors qu'une augmentation du niveau recrute progressivement des fibres de moyenne- et basse-AS. En utilisant de l'ouabaine, un agent pharmacologique qui agit sur les fibres à basse-AS, nous avons montré dans cette étude que la destruction des fibres à basse-AS n'affecte pas l'amplitude du PAC car leur réponse unitaire est à la fois retardée et moins bien synchronisée relativement aux fibres à moyenne- et haute-AS. Ce résultat suggère que la disparition des fibres à basse-activité serait indétectable avec les outils d'exploration fonctionnelle utilisés en laboratoire et en clinique (onde N_1 en électrocochléographie, onde I des potentiels évoqués auditifs précoces). Ce manque de sensibilité du PAC est d'autant plus inquiétante que les fibres à basse-AS sont les premières à disparaître au cours du vieillissement (Schmiedt et al., 1996, Sergeyenko et al., 2013) et après une surexposition sonore (Kujawa and Liberman, 2009, Furman et al., 2013). L'effet cumulé du vieillissement et de surexpositions sonores répétées pourrait donc conduire à une dégénérescence accélérée des fibres à basse-AS difficilement détectable avec les méthodes d'exploration fonctionnelle classiques, mais occasionnant pourtant une gêne considérable du codage des sons notamment dans un environnement bruyant (Starr et al., 1996, Zeng et al., 2005).

Pour compenser le manque de sensibilité du PAC, nous avons développé une méthode alternative qui mesure l'activité soutenue des fibres du nerf auditif. Cette approche est plus sensible à la perte des fibres à basse-AS que le PAC et reflète le nombre et la nature fonctionnelle de l'ensemble des fibres auditives distribuées le long de l'axe tonotopique. Pour aller plus loin, nous avons utilisé une approche permettant de mesurer à la fois les réponses synchrone et soutenue des fibres du nerf auditif. L'analyse de ces réponses permet d'évaluer la composition du nerf (fibres à haute-, moyenne- et basse-AS) ainsi que les constantes de temps d'adaptation du taux de décharge des fibres. Plus puissante sur le plan diagnostique que le PAC, cette technique pourrait être appliquée à l'homme, afin de dépister et préciser le phénotype des neuropathies auditives humaines (Zeng et al., 2005).

5.1. Action de l'ouabaïne sur les fibres du nerf auditif

L'ouabaïne est un glycoside cardiaque qui se lie spécifiquement à la pompe Na/K-ATPase et inhibe son activité (O'Brien et al., 1994). Cette pompe qui utilise l'énergie issue de la dégradation de l'ATP, permet d'échanger les ions sodium (Na^+) issus du milieu intracellulaire avec les ions potassium (K^+) issus du milieu extracellulaire contre leur gradient de concentration. Dans la cochlée, les pompes Na/K-ATPase sont exprimées sur les neurones de nerf auditif de type I au niveau du segment périphérique non-myélinisé (y compris le bouton synaptique) et dans la membrane du corps cellulaire (McLean et al., 2009). L'inhibition des pompes Na/K-ATPase entraîne un excès d'ions sodium dans le milieu intracellulaire, le gonflement puis la mort cellulaire de la fibre.

L'effet d'une application d'ouabaïne dans la niche de la fenêtre ronde varie de façon importante suivant le modèle animal utilisé en raison des différences anatomiques inter-espèces (Fu et al., 2012). Chez la gerbille, le nerf auditif est juste en dessous de la niche de la fenêtre ronde (Sokolich and Smith, 1973, Chamberlain, 1977). Par conséquent, l'ouabaïne accède directement au nerf auditif en traversant l'os spongieux et mince de la paroi interne de la fenêtre ronde. Chez le rat et le cochon d'Inde, le nerf auditif est loin de la fenêtre ronde. Ainsi, lorsque l'ouabaïne est appliquée dans la niche de la fenêtre ronde, elle doit alors traverser la membrane de la fenêtre ronde, se propager dans les liquides internes de la cochlée pour atteindre les fibres du nerf auditif situées dans l'organe de Corti. Cette différence anatomique d'accès aux fibres du nerf auditif explique la plus grande efficacité de l'ouabaïne chez la gerbille. Par exemple, la dose qui conduit à 50% de perte de fibres chez la gerbille se situe autour de 50 μM contre 1 mM pour le rat (Fu et al., 2012). A noter que chez le cochon d'Inde, l'ouabaïne affecte également les cellules ciliées externes en plus des neurones (Hamada and Kimura, 1999) ce qui exclut le cochon d'Inde des modèles animaux intéressants dans le contexte de l'étude des neuropathies induites par l'ouabaïne.

5.2. Ouabaïne et fibres à basse activité spontanée

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois que l'application d'une faible dose d'ouabaïne (33 μM) détruit préférentiellement les fibres à basse-AS. Ce résultat pourrait s'expliquer par des différences homéostatiques inter-fibres. Les fibres à haute-AS qui ont un plus grand diamètre et plus de mitochondries que les fibres à basse-AS

(Liberman, 1980, 1982, Merchan-Perez and Liberman, 1996) doivent avoir une plus grande concentration de pompes Na/K-ATPase pour assurer leur cadence de décharge élevée. Dans ce cas, une dose faible d'ouabaïne n'affecte pas beaucoup ces fibres. En revanche, les fibres à basse-AS qui ont un diamètre plus fin et moins les mitochondries n'expriment pas autant de pompes Na/K-ATPase, ce qui leur confère probablement une plus grande vulnérabilité à l'ouabaïne. Il serait très intéressant d'étudier ce mécanisme *ex vivo* avec des techniques de patch clamp du bouton synaptique (Rutherford et al., 2012) couplées à de la pharmacologie.

5.3. Pertinence physiologique du modèle « ouabaïne »

Le modèle de neuropathie utilisé au cours de cette étude est intéressant sur le plan expérimental car il permet de créer une perte sélective des fibres à basse activité spontanée comme observée au cours du vieillissement (Schmiedt et al., 1996, Sergeyenko et al., 2013) et après une surexposition sonore entraînant une élévation temporaire des seuils auditifs (Kujawa and Liberman, 2009, Lin et al., 2011, Furman et al., 2013). Le modèle ouabaïne présente certains avantages par rapport au modèle de surexposition sonore. En effet, il est possible de détruire 100% des fibres en utilisant une concentration de 100 μM sans pour autant altérer l'intégrité de la strie vasculaire et des cellules ciliées (Bourien et al., 2014). Il serait impossible d'atteindre une telle perte de fibres sans endommager l'activité des cellules ciliées avec un protocole de surexposition sonore. De plus, les résultats obtenus dans l'équipe avec ces différents protocoles montrent une plus grande reproductibilité inter-animal de l'effet obtenu par application de ouabaïne. Pour finir, le modèle ouabaïne à 33 μM élimine les fibres à basse-AS quelle que soit leur fréquence caractéristique alors que le modèle de surexposition sonore les élimine dans et au-delà de la bande fréquentielle du bruit traumatique (Furman et al., 2013). Ce modèle de neuropathie offre un cadre expérimental nouveau pour étudier l'effet d'une disparition complète de fibres à basse-AS sur les performances auditives. Il serait par exemple intéressant d'étudier à l'aide de tests comportementaux, notamment dans le bruit (test *go/no go* par exemple), les performances de gerbilles traitées à l'ouabaïne et de les comparer aux performances des gerbilles contrôles. Cette étude constitue une perspective prometteuse sur le plan fondamental comme sur le plan clinique d'autant que les fibres à basse activité spontanée pourraient être

plus fortement représentées chez l'homme (voir section « Fonction écologique des fibres à basse-AS » de cette discussion).

5.4. Contribution des fibres du nerf auditif au seuil audiométrique

De récentes études montrent que les seuils auditifs peuvent être normaux ou quasi-normaux malgré une perte importante de fibres du nerf auditif. Chez le chinchilla par exemple, une perte massive de CCI (~70%) induite par injection intrapéritonéale de carboplatine, modifie peu les seuils auditifs qu'ils soient mesurés avec des méthodes électrophysiologiques (El-Badry and McFadden, 2009) ou comportementales (Lobarinas et al., 2013). Chez la souris et le cochon d'inde, la délétion de 50% de fibres suite à une surexposition sonore ne modifie pas significativement les seuils auditifs (Kujawa and Liberman, 2009, Lin et al., 2011). Chez la gerbille, l'application de 66 μ M d'ouabaine entraîne 70% de perte de fibres dans la partie basale de la cochlée sans effet significatif sur le seuil auditif mesuré avec le PAC (Bourien et al., 2014). L'ensemble de ces résultats montre clairement que l'exploitation des seuils auditifs n'est pas suffisante pour apprécier l'intégrité des CCI et des fibres auditives. Par définition, seules les fibres à bas seuil (et à haute-AS) sont impliquées dans le codage des bas niveaux de stimulation, et la synchronisation d'un faible pourcentage de ces fibres pourrait suffire à faire émerger une réponse du bruit de fond. Pour évaluer l'intégrité de l'ensemble des fibres du nerf auditif, il est donc important de s'intéresser à l'amplitude des réponses obtenues à hauts niveaux de stimulation, lorsque les fibres à haut seuil (et à basse-AS) sont également recrutées.

5.5. Contribution des fibres à l'amplitude du PAC

En dépit de la théorie générale qui considère que les 3 classes de fibres sont impliquées dans l'amplitude du PAC pour des niveaux de stimulation supraliminaires, nous avons montré dans cette étude que les fibres à basse-AS sont mal représentées dans cette réponse. Relativement aux 2 autres classes, les fibres à basse-AS ont une mise à feu à la fois retardée et moins bien synchronisée. Des études antérieures avaient déjà relevé cette particularité. Chez le chat et le cochon d'Inde, des enregistrements de fibres unitaires avaient montré que la latence du premier potentiel d'action est plus longue pour les fibres à basse activité (Rhode and Smith, 1985, Versnel et al., 1990). D'autres études plus récentes,

menées chez la souris, ont montré que la variance du premier potentiel d'action est plus grande pour les fibres à basse-AS (Oliver et al., 2006, Buran et al., 2010). Grâce à des enregistrements simultanés fibre/PAC, nous avons démontré que les deux mécanismes (retard et variance élevée) coexistent.

L'origine de cette différence de synchronisation pourrait dépendre du degré de coordination de la libération synaptique. Dans les cellules ciliées internes, le taux de fusion vésiculaire dépend très fortement du calcium intracellulaire. Or de nombreuses études ont observé une forte variabilité du signal calcique présynaptique pour une même cellule (Beutner et al., 2001, Frank et al., 2009, Meyer et al., 2009, Grant et al., 2010). Ainsi, le phénotype d'une fibre pourrait être déterminé par le nombre de canaux calciques dans la zone active qui entoure le ruban synaptique. En outre, des enregistrements *ex vivo* du bouton synaptique de fibres de rats adultes ont montré qu'une grande majorité des terminaisons exhibaient de grands courants post-synaptiques excitateurs (CPSE) de type monophasique (70% des événements) tandis qu'une minorité de fibres exhibaient plutôt des petits EPSC multiphasiques (Grant et al., 2010). Les grands CPSE monophasiques, qui résultent d'une forte coordination de la libération vésiculaire, pourraient être associés aux fibres à haute-AS alors que les CPSE multiphasiques, qui résultent d'une libération vésiculaire moins coordonnée, pourraient être associés aux fibres à basse-AS expliquant ainsi leur faible degré de synchronisation.

Cette hypothèse est soutenue par des mesures de latence de potentiels d'action déclenchés par des CPSE rapides ou lents (Rutherford et al., 2012). Un CPSE avec une pente raide (~ 250 mV/ms, probablement associé à un CPSE monophasique) déclenche un potentiel d'action avec une latence courte (~ 300 μ s). En revanche, un CPSE avec une pente faible (~ 50 mV/ms, probablement associé à un CPSE multiphasique) déclenche un potentiel d'action plus tardivement. Les différences de latence (~ 400 μ s) observées dans cette étude menée chez le rat *ex vivo*, sont en accord avec celles observées dans notre étude entre les fibres à haute- et basse-AS. Enfin, les fibres à basse-AS pourraient contenir un mélange de CPSE monophasiques et multiphasiques (Grant et al., 2010) parce que leur zone active présynaptique pourrait avoir moins de vésicules de glutamate et/ou moins de canaux calciques (Graydon et al., 2011). Par ailleurs, le rétrocontrôle inhibiteur dopaminergique assuré par le système efférent latéral peut constituer un mécanisme supplémentaire pour moduler l'activité spontanée d'une fibre (Ruel et al., 2001).

Ces différences pourraient également être liées aux temps de récupération post-stimulation des fibres. En effet, cette période de récupération, à l'origine des phénomènes de masquage temporel (Harris and Dallos, 1979), est beaucoup plus longue pour les fibres à basse activité spontanée. Dans leur étude effectuée chez le chinchilla, pour un son pur présenté à 80 dB SPL, (Relkin and Doucet, 1991) mettent en évidence une différence correspondant à un facteur 10 (2 secondes de récupération pour les fibres à basse-AS contre 200 ms pour les fibres à haute-AS). Avec les hautes cadences de stimulation utilisées en laboratoire et en clinique pour enregistrer la réponse synchrone des fibres auditives, une mauvaise récupération entre chaque stimulation, accentuée pour les fibres à basse-AS, pourrait expliquer une diminution (retard et désynchronisation) des réponses obtenues en début de stimulation. Ce phénomène est mis en évidence par l'étude de (Starr et al., 2000) montrant, dans le cadre des potentiels évoqués auditifs précoces, qu'une réduction du rythme de présentation du clic à 10, voire 5 Hz, permet dans certains cas de préserver une réponse synchrone absente lors des stimulations aux rythmes usuels de 20 à 30 Hz.

Quoi qu'il en soit, nos données électrophysiologiques soutiennent l'hypothèse que les fibres à basse-AS ne participent pas à l'amplitude du PAC en raison de leur réponse retardée et peu synchronisée. Des simulations mathématiques confortent ce résultat et montrent que l'écart de synchronisation de l'ordre de quelques centaines de μ s, entre fibres à basse- et haute-AS est suffisant pour abolir la contribution des fibres à basse-AS à l'amplitude du PAC (Bourien et al., 2014). Ce résultat contraste pourtant avec l'apparente contribution des fibres basse-AS au PAC observé chez la gerbille âgée (Schmiedt et al., 1996) et chez le cochon d'inde soumis à une surexposition sonore (Furman et al., 2013). Cette différence entre nos conclusions et celles de ces études provient probablement du fait que les auteurs ont regroupés les fibres à basse- et moyenne-AS dans un même groupe appelé fibres à basse activité spontanée.

5.6. Fonction écologique des fibres à basse activité spontanée

Quel que soit le modèle animal considéré, la proportion de fibres à haute, moyenne et basse activité spontanée est quasi identique avec respectivement 65% ($AS \geq 18$ spikes/s), 25% ($0,5 \leq AS < 18$ spikes/s), 10% ($AS < 0,5$ spike/s ; chat : (Lieberman, 1978); gerbille : (Schmiedt, 1989); cochon d'inde : (Tsuji and Liberman, 1997); revue : (Taberner and Liberman, 2005)). Toutefois, contrairement au chat et au cochon d'inde pour lesquels ces

proportions sont maintenues tout le long de l'axe tonotopique, chez la gerbille ces proportions sont très différentes à l'apex et à la base. Cette différence ne peut être imputée à l'échantillonnage inhérent à la technique de l'enregistrement unitaire car toutes les études traitant de l'activité unitaire des fibres chez la gerbille relèvent cette singularité (Schmiedt, 1989, Ohlemiller and Echteler, 1990, Muller, 1996, Bourien et al., 2014). Cette différence base/apex pourrait résulter de contraintes écologiques. Au-dessous de 4 kHz, la gerbille doit disposer d'excellents seuils auditifs pour détecter les signaux d'alerte émis par ses congénères à l'approche d'un prédateur (Plassmann et al., 1987). Dans cette gamme fréquentielle, il est donc raisonnable d'imaginer que l'évolution a surreprésenté des fibres à bas seuil. En revanche, au-dessus de 4 kHz, une répartition plus homogène des 3 classes de fibres permettrait un codage du niveau sur une plus grande dynamique permettant ainsi un excellent codage des vocalisations de gerbilles dont le contenu spectral est supérieur à 4 kHz (Kobayasi and Riquimaroux, 2012).

Les données expérimentales montrant que les fibres à basse activité spontanée codent mieux l'enveloppe temporelle (Joris and Yin, 1992, Cooper et al., 1993), notamment dans le bruit (Costalupes et al., 1984), suggèrent que ces fibres sont spécialisées pour le codage des zones conversationnelles. On peut donc supposer que le nerf auditif de l'homme est peuplé par une grande proportion de fibres à basse activité spontanée notamment dans la gamme fréquentielle de la parole (~ 300-3000 Hz). Il est donc tout à fait envisageable que l'effet d'une surexposition sonore qui affecte préférentiellement les fibres à basse-AS (Kujawa and Liberman, 2009, Lin et al., 2011, Furman et al., 2013) ait un effet dévastateur sur l'audition de l'homme notamment dans des environnements bruyants.

Notons que le tableau des neuropathies auditives peut dans certains cas présenter des similitudes avec celui des troubles (centraux) du traitement de l'audition (TCTA). En effet, certains patients atteints de neuropathie semblent présenter une audition normale à la notable exception d'importantes difficultés de compréhension dans un environnement bruyant (Berlin et al., 2003). On peut souvent étiqueter à tort ces patients comme présentant un TCTA. Actuellement, on distingue une neuropathie d'un TCTA par une importante altération des PEAP. Or les travaux présentés dans cette thèse montrent qu'une neuropathie peut coexister avec une préservation de la réponse synchrone du nerf auditif, en particulier lorsque cette neuropathie affecte les fibres à basse activité spontanée: les plus sensibles à une surexposition sonore (Furman et al., 2013) et les plus impliquées dans le codage dans le

bruit (Costalupes et al., 1984). Ces considérations montrent l'enjeu du développement d'une nouvelle mesure objective permettant de détecter la perte de fibres à basse-AS.

5.7. Activité spontanée du nerf auditif et origine du dôme à 900 Hz

La technique la plus utilisée en laboratoire pour mesurer l'activité spontanée du nerf auditif consiste à enregistrer le bruit de fond cochléaire en absence de stimulation, à l'aide d'une électrode de mesure placée dans la niche de la fenêtre ronde (Dolan et al., 1990). L'analyse fréquentielle de ce signal (analyse de Fourier) fait émerger une composante spectrale centrée sur le 900 Hz. La preuve directe que cette composante reflète l'activité spontanée du nerf n'a jamais été clairement établie mais un faisceau important d'expériences la soutienne. Cette composante à 900 Hz disparaît après l'abolition pharmacologique de l'activité électrophysiologique des fibres (Dolan et al., 1990, McMahon and Patuzzi, 2002); À l'inverse, elle se grade en réponse à une stimulation sonore large bande (Dolan et al., 1990, Cazals and Huang, 1996) ; Pour finir, elle correspond au spectre de la forme d'onde extracellulaire d'un potentiel d'action unitaire mesuré depuis la niche de la fenêtre ronde (Kiang et al., 1976, Wang, 1979, Prijs, 1986, Patuzzi et al., 2004).

Pour illustrer ce dernier point, nous avons numérisé et analysé la forme d'onde moyenne obtenue par Wang chez le chat (**Figure 5.1A**, (Wang, 1979)). Ce signal biphasique d'une centaine de nanovolt d'amplitude et de durée proche d'une milliseconde est caractérisé dans le domaine spectral (**Figure 5.1B**) par une composante centrée sur le 1000 Hz (liée à la durée de la forme d'onde extracellulaire) suivie d'une lente décroissance vers les fréquences élevées à raison de -5 dB/kHz. L'évidente similitude entre le spectre de cette onde élémentaire et le bruit de fond cochléaire présenté dans la **figure 4.10** suggère que le bruit de fond cochléaire représente la sommation électrique, à distance, de ces formes d'ondes élémentaires.

En l'absence de stimulation acoustique, le dôme spectral centré sur 900 Hz reflète l'activité spontanée des fibres auditives (Dolan et al., 1990, McMahon and Patuzzi, 2002, Patuzzi et al., 2004, Searchfield et al., 2004). De nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à cette activité dans le cadre de l'étude des acouphènes (Schreiner, 1987, Martin, 1995, Cazals et al., 1998). Chez le chat et le lapin, les réponses obtenues après administration de fortes doses de salicylate (modèle réversible d'acouphènes, (McCabe and

Dey, 1965)) suggèrent que l'émergence d'une raie spectrale autour de 200 Hz pourrait être liée à l'apparition d'acouphènes. Cependant, le signal recueilli au contact de la cochlée contient de nombreuses composantes extracochléaires (activité musculaire, cardiaque, harmoniques du 50 Hz), principalement situées dans les basses fréquences, et pouvant varier selon les conditions d'enregistrement. Il est donc souvent délicat d'interpréter les variations d'activité spontanée observées en dessous de 300 Hz.

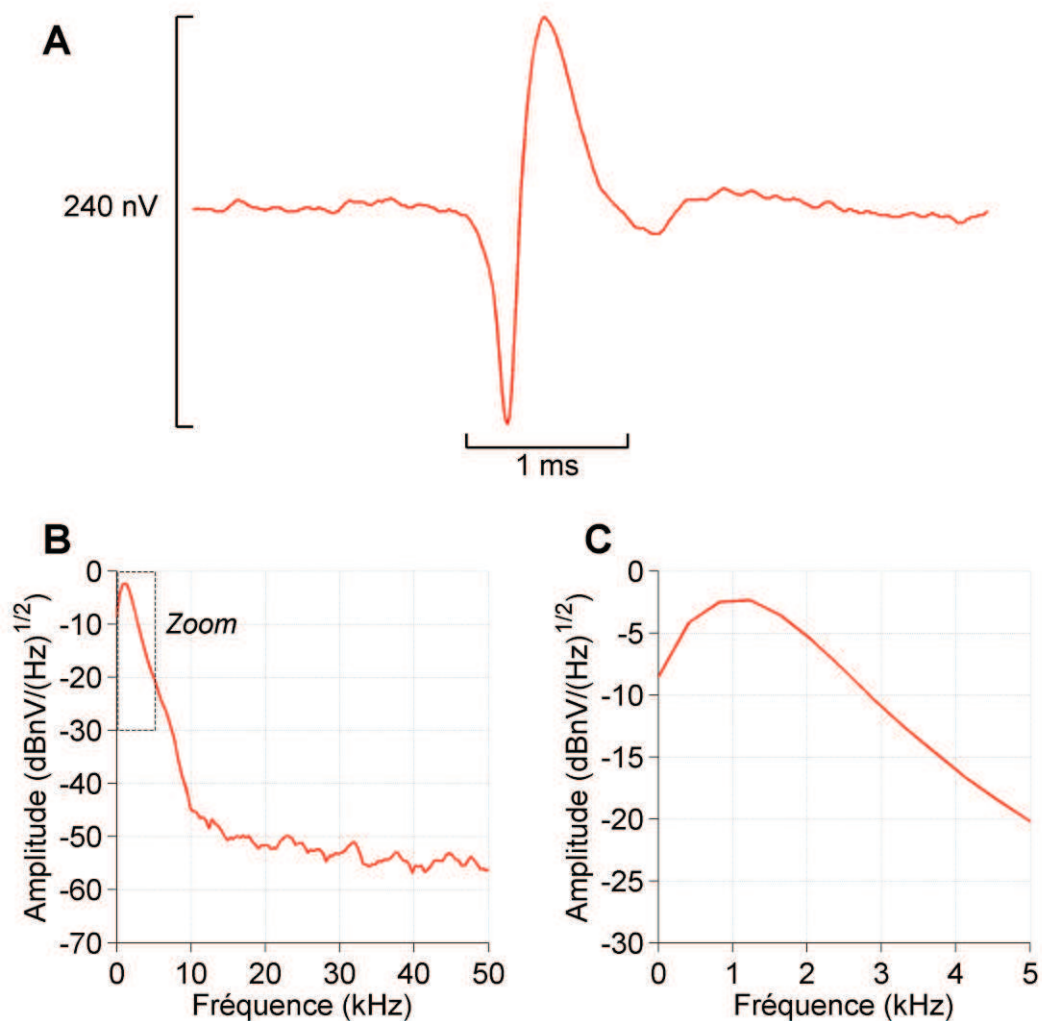


Figure 5.1 : Origine du dôme neural centré sur 1 kHz (d'après la Figure 14 de (Wang, 1979)). A. Forme d'onde extracellulaire d'un potentiel d'action unitaire de fibres du nerf auditif de chat enregistré depuis la niche de la fenêtre ronde. B. Densité spectrale de puissance (DSP) de la forme d'onde présentée dans le panel A entre 0 et 50 kHz. C. Grossissement de la DSP présentée en B, entre 0 et 5 kHz. Le maximum de puissance est obtenu à 1 kHz, la décroissance du spectre au-delà de 2 kHz est de ~ -5 dB/kHz.

5.8. Activité soutenue des fibres du nerf auditif

L'originalité de notre mesure de l'activité soutenue du nerf auditif repose sur l'opération de soustraction du spectre spontané au spectre évoqué par une bande de bruit. Cette technique permet d'évaluer l'activité évoquée des fibres recrutées par la stimulation en s'affranchissant de toute activité extracochléaire. Cette activité soutenue, évoquée par une bande étroite de bruit présentée de façon continue, est beaucoup plus sensible à la perte des fibres à basse-AS que la réponse synchrone du nerf auditif (**Figure 4.18**). Utilisée en clinique, elle pourrait faciliter le dépistage des neuropathies auditives liées à la perte de ces fibres, qui sont les premières à disparaître au cours du vieillissement (Schmiedt et al., 1996, Sergeyenko et al., 2013) et après une surexposition sonore (Kujawa and Liberman, 2009, Furman et al., 2013).

L'évaluation tonotopique de l'activité soutenue permet d'étudier la distribution des fibres auditives le long de la cochlée. En effet, la contribution des potentiels d'action unitaires des fibres à la réponse soutenue enregistrée depuis la niche de la fenêtre ronde est identique quelles que soient la fréquence caractéristique et l'activité spontanée de la fibre (Kiang et al., 1976, Wang, 1979, Prijs, 1986). D'autre part, pour un niveau de stimulation de 60 dB SPL, la réponse évoquée des fibres est identique (+160 PA/s) quel que soit leur phénotype fonctionnel (**Figure 4.9**). Ainsi, l'analyse des réponses obtenues à 60 dB SPL, pour différentes fréquences de stimulation, donne une estimation du nombre de fibres réparties le long de la cochlée (**Figure 4.17**). Étudiée dans le cadre d'une neuropathie, cette répartition permet de localiser et de quantifier les pertes de fibres auditives.

Après le dépistage et la localisation des pertes de fibres, la mesure de l'activité soutenue peut donner des indications sur les propriétés fonctionnelles des fibres conservées. En effet, en étudiant la progression de l'activité soutenue avec le niveau de stimulation, on peut s'attendre à différents profils de réponses selon les propriétés de codage des fibres conservées. Lorsqu'il s'agit d'une perte de fibres à basse-AS (comme dans le modèle présenté dans cette thèse), on observe une bonne conservation des seuils auditifs et des amplitudes obtenues à bas niveaux de stimulation, suggérant une bonne conservation des fibres à haute-AS (**Figure 4.16**). Dans un modèle où les différentes classes de fibres (basse-, moyenne- et haute-AS) seraient affectées de façon homogène, on peut s'attendre à une progression continue mais faible sur l'ensemble de la dynamique de stimulation. Dans

cet esprit, la perte de fibres à haute-AS pourrait être traduite par une faible progression des réponses obtenues à bas niveaux de stimulation et une forte augmentation de l'activité soutenue à hauts niveaux de stimulation. Ainsi, l'analyse de l'activité soutenue pourrait offrir une image « électrophysiologique » du nombre et de la nature fonctionnelle des fibres auditives réparties le long de la cochlée.

Les résultats obtenus dans le modèle de neuropathie étudié ouvrent de nombreuses perspectives. Au sein du laboratoire, cette activité soutenue est dès à présent utilisée pour évaluer les propriétés fonctionnelles des fibres chez différentes espèces (cochon d'inde et rat) et différents modèles de neuropathie (surexposition sonore et presbyacousie). En parallèle, un set-up d'enregistrement est actuellement amélioré pour être utilisé en clinique. Une étude préliminaire est envisagée au bloc opératoire, chez des patients programmés pour une chirurgie de l'oreille moyenne ou de l'oreille interne donnant accès à la niche de la fenêtre ronde. Notre premier objectif serait d'enregistrer et d'analyser le spectre de l'activité cochléaire évoquée par des bandes étroites de bruit.

Notons que pour mesurer l'activité soutenue du nerf auditif (aussi appelée activité asynchrone selon Yves Cazals), il ne faut pas utiliser un son pur comme son test. En effet, l'utilisation d'un son pur semble engendrer une inhibition latérale (Henry and Lewis, 1992) ou un phénomène de synchronisation (Eggermont, 1990, Cazals and Huang, 1996) qui réduit à néant la sommation globale de l'activité évoquée. Ainsi, l'amplitude du dôme centré sur le 900 Hz varie peu, voire diminue, en réponse à un son pur (Dolan et al., 1990, Cazals and Huang, 1996).

5.9. Peri-stimulus time response (PSTR)

La deuxième méthode mise au point dans cette thèse, que nous avons nommée PSTR par analogie avec le PSTH des fibres, permet d'évaluer à la fois les réponses synchrones et soutenues des fibres du nerf auditif. Les enregistrements simultanés (PSTH/PSTR) ont montré que la PSTR représente la sommation des PSTH des fibres recrutées par la stimulation. Cette méthode, qui permet d'étudier le taux de décharge des fibres au cours du temps, et donc les constantes de temps d'adaptation des fibres, présente plusieurs avantages expérimentaux : i) elle est moins invasive et plus simple à mettre en œuvre que l'enregistrement unitaire (donc potentiellement applicable à l'homme), ii) elle permet d'ajuster

la bande fréquentielle étudiée (par opposition à l'unitaire qui ne rend compte que d'une fibre détectée de façon aléatoire), *iii*) elle permet de réaliser une étude tonotopique de l'activité des fibres auditives.

Dans cette étude préliminaire, les bandes de bruit pulsées étaient générées à partir d'un bruit blanc (processus aléatoire) filtré. Lorsque la composante microphonique se situe dans les hautes fréquences (hautes fréquences de stimulation), il est facile d'isoler la réponse neurale à l'aide d'un filtre passe-bande correspondant à sa gamme fréquentielle (300 - 1200 Hz). Cependant, lorsque la composante microphonique se situe dans la gamme fréquentielle de la réponse neurale (fréquences de stimulation ≤ 2 kHz), il devient impossible de supprimer la composante microphonique sans affecter la réponse neurale. C'est pourquoi à l'avenir nous souhaitons utiliser des bandes de bruit pulsées dont le contenu spectral sera semi-aléatoire, de façon à générer une suite de paires de motifs pseudo-aléatoires de polarité alternée. Ainsi, quelle que soit la bande fréquentielle de stimulation, le moyennage des réponses obtenues permettra de supprimer la composante microphonique et de faire émerger la réponse neurale. En vue d'une application clinique, l'étude du codage des basses fréquences de stimulation présente un intérêt majeur dans le cadre de l'évaluation des réponses auditives chez le jeune enfant. Tandis que les potentiels évoqués auditifs précoces renseignent le clinicien sur les seuils auditifs correspondant aux hautes fréquences de stimulation (2000 - 4000 Hz), aucune mesure fiable n'est actuellement disponible pour évaluer les seuils auditifs correspondant aux basses fréquences de stimulation. Ces derniers ont pourtant un rôle décisif sur le bilan d'orientation prothétique (appareillage conventionnel, implant électro-acoustique, implant cochléaire).

Au delà de l'étude des seuils auditifs, la PSTR nous permet d'étudier les propriétés de codage temporel des fibres auditives. La composante rapide de cette réponse reflète la synchronisation des décharges évoquées en début de stimulation. Son amplitude et sa constante de temps semblent liées à la fusion rapide ($1 \text{ ms} < \tau < 10 \text{ ms}$) d'un contingent de vésicules synaptiques ancrées à la membrane et prêtes à fusionner (*readily releasable pool-RRP* ; (Moser and Beutner, 2000)). La composante soutenue de cette réponse pourrait quant à elle refléter la fusion vésiculaire soutenue liée au réapprovisionnement des vésicules aux zones actives (*slowly releasable pool-SRP*). Notons que la PSTR facilite l'analyse de ces différentes composantes car sa résolution temporelle et sa reproductibilité sont bien meilleures que celles des réponses unitaires. En effet, le PSTH est une estimation statistique

soumise à l'effet de pas d'histogramme (pour un pas de 0,5 ms, il faut présenter au moins 500 fois la stimulation pour obtenir un PSTH lisse). Avec la PSTR, une cinquantaine de présentations suffisent pour obtenir une réponse lisse et stable.

À 50 - 60 dB SPL, l'étude des PSTR obtenues le long de l'axe tonotopique (**Figure 4.25**) montre que la mesure du rapport pic/plateau semble un bon indicateur de la nature fonctionnelle des fibres (basse- ou haute-AS) présentes dans la zone stimulée. En effet, les réponses des fibres à basse-AS sont peu synchronisées en début de stimulation ; leur contribution à la composante rapide de la PSTR (pic de synchronisation) est donc limitée. Par contre, leur contribution à l'activité soutenue est équivalente à celle des fibres à haute-AS. Ainsi, tandis que l'amplitude du plateau est lié au nombre total de fibres recrutées, l'amplitude du pic de synchronisation de la PSTR reflète surtout la participation des fibres à haute-AS. Une plus grande proportion de fibres à haute-AS (comme dans les basses-fréquences chez la gerbille) se traduit donc par un rapport pic/plateau plus élevé.

Les résultats obtenus dans cette étude préliminaire sont très encourageants. Nous sommes enthousiastes à l'idée d'étudier les propriétés des PSTR obtenues dans un modèle de neuropathie à dominante synaptique. Par exemple, l'invalidation du gène qui code pour Basson se traduit par la perte des rubans ancrés à la membrane (Khimich et al., 2005, Frank et al., 2010). Dans ce modèle, l'absence de ruban est associée à une réduction du nombre de vésicules arrimées à la membrane et à une réduction de l'exocytose rapide observée en début de stimulation. Dans ce modèle de synaptopathie, la PSTR devrait mettre en évidence une diminution du pic de synchronisation et une bonne conservation du plateau. Notons également que le codage temporel des réponses neurales pourrait être étudié dans différentes conditions de stimulation (signal modulé en amplitude, interrompu etc.) afin de se rapprocher des tests psychoacoustiques également utilisés dans le cadre de l'étude des neuropathies (détection d'une profondeur de modulation, détection d'un silence (Zeng et al., 2005)).

5.10. Conclusion et perspectives

Ce travail de thèse avait pour but de développer une nouvelle méthode d'exploration fonctionnelle rendant compte du nombre et des propriétés fonctionnelles des fibres du nerf auditif. Après avoir mis en évidence le manque de sensibilité de la réponse synchrone

actuellement étudiée en clinique, nous avons expérimenté deux nouvelles approches potentiellement applicables à l'homme.

Contrairement à l'amplitude de la réponse synchrone, l'activité soutenue du nerf auditif permet d'étudier l'activité de l'ensemble des fibres auditives. Très sensible, cette mesure facilite le dépistage et la quantification des pertes de fibres auditives. D'autre part, l'étude de la PSTR permet d'étudier le codage temporel des fibres auditives. Reflétant les mécanismes de neurotransmission, cette mesure pourrait faciliter le dépistage des synaptopathies.

Compte tenu du caractère translationnel de ce travail, les perspectives cliniques sont prometteuses. L'application la plus évidente concerne évidemment le dépistage et la classification des neuropathies auditives humaines (Starr et al., 1996). À plus long terme, ces mesures pourraient être adaptées à l'étude des fibres auditives stimulées chez les patients implantés cochléaires. En profitant des électrodes à disposition le long de la cochlée, ces mesures pourraient nous aider à comprendre, voire à améliorer (ajustement des réglages), les performances de certains patients.

6. REFERENCES

- Aran J.M. PC, Delaunay J., Pelerin J. et Lenoir J. (1969) L'électrocochléogramme : Méthodes et premiers résultats chez l'enfant. *Rev Laryngol* 90:615-634.
- Baig SM, Koschak A, Lieb A, Gebhart M, Dafinger C, Nurnberg G, Ali A, Ahmad I, Sinnegger-Brauns MJ, Brandt N, Engel J, Mangoni ME, Farooq M, Khan HU, Nurnberg P, Striessnig J, Bolz HJ (2011) Loss of Ca(v)1.3 (CACNA1D) function in a human channelopathy with bradycardia and congenital deafness. *Nat Neurosci* 14:77-84.
- Benser ME, Marquis RE, Hudspeth AJ (1996) Rapid, active hair bundle movements in hair cells from the bullfrog's sacculus. *J Neurosci* 16:5629-5643.
- Berlin CI, Hood L, Morlet T, Rose K, Brashears S (2003) Auditory neuropathy/dys-synchrony: diagnosis and management. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 9:225-231.
- Beutner D, Voets T, Neher E, Moser T (2001) Calcium dependence of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse. *Neuron* 29:681-690.
- Blanchet C, Erostegeui C, Sugawara M, Dulon D (1996) Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J Neurosci* 16:2574-2584.
- Bobbin RP, Konishi T (1971) Acetylcholine mimics crossed olivocochlear bundle stimulation. *Nat New Biol* 231:222-223.
- Bourien J, Tang Y, Batrel C, Huet A, Lenoir M, Ladrech S, Desmadryl G, Nouvian R, Puel JL, Wang J (2014) Contribution of auditory nerve fibers to compound action potential of the auditory nerve. *J Neurophysiol* 112:1025-1039.
- Brandt A, Striessnig J, Moser T (2003) CaV1.3 channels are essential for development and presynaptic activity of cochlear inner hair cells. *J Neurosci* 23:10832-10840.
- Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de Ribaupierre Y (1985) Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227:194-196.
- Buran BN, Strenzke N, Neef A, Gundelfinger ED, Moser T, Liberman MC (2010) Onset coding is degraded in auditory nerve fibers from mutant mice lacking synaptic ribbons. *J Neurosci* 30:7587-7597.
- Casimiro MC, Knollmann BC, Ebert SN, Vary JC, Jr., Greene AE, Franz MR, Grinberg A, Huang SP, Pfeifer K (2001) Targeted disruption of the Kcnq1 gene produces a mouse model of Jervell and Lange-Nielsen Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2526-2531.
- Cazals Y, Horner KC, Huang ZW (1998) Alterations in average spectrum of cochleoneural activity by long-term salicylate treatment in the guinea pig: a plausible index of tinnitus. *J Neurophysiol* 80:2113-2120.
- Cazals Y, Huang ZW (1996) Average spectrum of cochlear activity: a possible synchronized firing, its olivo-cochlear feedback and alterations under anesthesia. *Hear Res* 101:81-92.
- Chamberlain SC (1977) Neuroanatomical aspects of the gerbil inner ear: light microscope observations. *J Comp Neurol* 171:193-204.
- Cheatham MA, Huynh KH, Gao J, Zuo J, Dallos P (2004) Cochlear function in Prestin knockout mice. *J Physiol* 560:821-830.
- Cone-Wesson B, Dowell RC, Tomlin D, Rance G, Ming WJ (2002) The auditory steady-state response: comparisons with the auditory brainstem response. *J Am Acad Audiol* 13:173-187; quiz 225-176.
- Cooper NP, Robertson D, Yates GK (1993) Cochlear nerve fiber responses to amplitude-modulated stimuli: variations with spontaneous rate and other response characteristics. *J Neurophysiol* 70:370-386.
- Costalupes JA, Young ED, Gibson DJ (1984) Effects of continuous noise backgrounds on rate response of auditory nerve fibers in cat. *J Neurophysiol* 51:1326-1344.

- Crawford AC, Fettiplace R (1985) The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlear hair cells. *J Physiol* 364:359-379.
- Dallos P, Harris D (1978) Properties of auditory nerve responses in absence of outer hair cells. *J Neurophysiol* 41:365-383.
- Darrow KN, Maison SF, Liberman MC (2006) Cochlear efferent feedback balances interaural sensitivity. *Nat Neurosci* 9:1474-1476.
- Darrow KN, Maison SF, Liberman MC (2007) Selective removal of lateral olivocochlear efferents increases vulnerability to acute acoustic injury. *J Neurophysiol* 97:1775-1785.
- Davis RI, Ahroon WA, Hamernik RP (1989) The relation among hearing loss, sensory cell loss and tuning characteristics in the chinchilla. *Hear Res* 41:1-14.
- Delpire E, Lu J, England R, Dull C, Thorne T (1999) Deafness and imbalance associated with inactivation of the secretory Na-K-2Cl co-transporter. *Nat Genet* 22:192-195.
- Denk W, Webb WW (1992) Forward and reverse transduction at the limit of sensitivity studied by correlating electrical and mechanical fluctuations in frog saccular hair cells. *Hear Res* 60:89-102.
- Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH (2003) The presynaptic active zone protein bassoon is essential for photoreceptor ribbon synapse formation in the retina. *Neuron* 37:775-786.
- Dixon MJ, Gazzard J, Chaudhry SS, Sampson N, Schulte BA, Steel KP (1999) Mutation of the Na-K-Cl co-transporter gene *Slc12a2* results in deafness in mice. *Hum Mol Genet* 8:1579-1584.
- Dolan DF, Nuttall AL, Avinash G (1990) Asynchronous neural activity recorded from the round window. *J Acoust Soc Am* 87:2621-2627.
- Eggermont JJ (1990) Temporal modulation transfer functions for single neurons in the auditory midbrain of the leopard frog. Intensity and carrier-frequency dependence. *Hear Res* 43:181-198.
- El-Badry MM, McFadden SL (2009) Evaluation of inner hair cell and nerve fiber loss as sufficient pathologies underlying auditory neuropathy. *Hear Res* 255:84-90.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S (1994) Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705-715.
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J (2001) alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-3506.
- ErosteGUI C, Nenov AP, Norris CH, Bobbin RP (1994) Acetylcholine activates a K⁺ conductance permeable to Cs⁺ in guinea pig outer hair cells. *Hear Res* 81:119-129.
- Evans EF, Klink R (1982) The effects of intracochlear cyanide and tetrodotoxin on the properties of single cochlear nerve fibres in the cat. *J Physiol* 331:385-408.
- Evans MG (1996) Acetylcholine activates two currents in guinea-pig outer hair cells. *J Physiol* 491 (Pt 2):563-578.
- Eybalin M (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73:309-373.
- Fettiplace R, Hackney CM (2006) The sensory and motor roles of auditory hair cells. *Nat Rev Neurosci* 7:19-29.
- Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, Gawenis LR, Kramer J, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, Cardell EL, Shull GE (1999) Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J Biol Chem* 274:26946-26955.
- Frank T, Khimich D, Neef A, Moser T (2009) Mechanisms contributing to synaptic Ca²⁺ signals and their heterogeneity in hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4483-4488.
- Frank T, Rutherford MA, Strenzke N, Neef A, Pangrsic T, Khimich D, Fejtova A, Gundelfinger ED, Liberman MC, Harke B, Bryan KE, Lee A, Egner A, Riedel D, Moser T (2010) Bassoon and the

- synaptic ribbon organize Ca^{2+} channels and vesicles to add release sites and promote refilling. *Neuron* 68:724-738.
- Froehlich P, Collet L, Morgon A (1990) [Effect of attention on audition. Contribution of the study of the olivocochlear efferent system]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac* 107:519-520.
- Fu Y, Ding D, Jiang H, Salvi R (2012) Ouabain-induced cochlear degeneration in rat. *Neurotox Res* 22:158-169.
- Fuchs PA, Murrow BW (1992) Cholinergic inhibition of short (outer) hair cells of the chick's cochlea. *J Neurosci* 12:800-809.
- Furman AC, Kujawa SG, Liberman MC (2013) Noise-induced cochlear neuropathy is selective for fibers with low spontaneous rates. *J Neurophysiol* 110:577-586.
- Glowatzki E, Fuchs PA (2002) Transmitter release at the hair cell ribbon synapse. *Nat Neurosci* 5:147-154.
- Goldstein MH, Kiang NYS (1958) Synchrony of neural activity in electric responses evoked by transient acoustic stimuli. *J Acoust Soc Am* 30:107-114.
- Goutman JD, Glowatzki E (2007) Time course and calcium dependence of transmitter release at a single ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16341-16346.
- Grant L, Yi E, Glowatzki E (2010) Two modes of release shape the postsynaptic response at the inner hair cell ribbon synapse. *J Neurosci* 30:4210-4220.
- Graydon CW, Cho S, Li GL, Kachar B, von Gersdorff H (2011) Sharp Ca^{2+} nanodomains beneath the ribbon promote highly synchronous multivesicular release at hair cell synapses. *J Neurosci* 31:16637-16650.
- Gregory FD, Bryan KE, Pangrsic T, Calin-Jageman IE, Moser T, Lee A (2011) Harmonin inhibits presynaptic $\text{Cav}1.3$ Ca^{2+} channels in mouse inner hair cells. *Nat Neurosci* 14:1109-1111.
- Hamada M, Kimura RS (1999) Morphological changes induced by administration of a Na^+ , K^+ -ATPase inhibitor in normal and hydropic inner ears of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 119:778-786.
- Harris DM, Dallos P (1979) Forward masking of auditory nerve fiber responses. *J Neurophysiol* 42:1083-1107.
- Heidrych P, Zimmermann U, Bress A, Pusch CM, Ruth P, Pfister M, Knipper M, Blin N (2008) Rab8b GTPase, a protein transport regulator, is an interacting partner of otoferlin, defective in a human autosomal recessive deafness form. *Hum Mol Genet* 17:3814-3821.
- Heil P, Irvine DR (1997) First-spike timing of auditory-nerve fibers and comparison with auditory cortex. *J Neurophysiol* 78:2438-2454.
- Henry KR, Lewis ER (1992) One-tone suppression in the cochlear nerve of the gerbil. *Hear Res* 63:1-6.
- Holt M, Cooke A, Neef A, Lagnado L (2004) High mobility of vesicles supports continuous exocytosis at a ribbon synapse. *Curr Biol* 14:173-183.
- Hossain WA, Antic SD, Yang Y, Rasband MN, Morest DK (2005) Where is the spike generator of the cochlear nerve? Voltage-gated sodium channels in the mouse cochlea. *J Neurosci* 25:6857-6868.
- Housley GD, Ashmore JF (1991) Direct measurement of the action of acetylcholine on isolated outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Proc Biol Sci* 244:161-167.
- Howard J, Hudspeth AJ (1987) Mechanical relaxation of the hair bundle mediates adaptation in mechanoelectrical transduction by the bullfrog's saccular hair cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:3064-3068.
- Huang G, Santos-Sacchi J (1994) Motility voltage sensor of the outer hair cell resides within the lateral plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12268-12272.
- Issa NP, Hudspeth AJ (1994) Clustering of Ca^{2+} channels and Ca^{2+} -activated K^+ channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7578-7582.
- Issa NP, Hudspeth AJ (1996) The entry and clearance of Ca^{2+} at individual presynaptic active zones of hair cells from the bullfrog's sacculus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9527-9532.
- Jaramillo F, Wiesenfeld K (1998) Mechano-electrical transduction assisted by Brownian motion: a role for noise in the auditory system. *Nat Neurosci* 1:384-388.

- Johnson SL, Beurg M, Marcotti W, Fettiplace R (2011) Prestin-driven cochlear amplification is not limited by the outer hair cell membrane time constant. *Neuron* 70:1143-1154.
- Johnson SL, Marcotti W, Kros CJ (2005) Increase in efficiency and reduction in Ca^{2+} dependence of exocytosis during development of mouse inner hair cells. *J Physiol* 563:177-191.
- Joris PX, Yin TC (1992) Responses to amplitude-modulated tones in the auditory nerve of the cat. *J Acoust Soc Am* 91:215-232.
- Katsuki Y, Sumi T, Uchiyama H, Watanabe T (1958) Electric responses of auditory neurons in cat to sound stimulation. *J Neurophysiol* 21:569-588.
- Katsuki Y, Yanagisawa K, Kanzaki J (1966) Tetraethylammonium and tetrodotoxin: effects on cochlear potentials. *Science* 151:1544-1545.
- Kawase T, Liberman MC (1992) Spatial organization of the auditory nerve according to spontaneous discharge rate. *J Comp Neurol* 319:312-318.
- Kennedy HJ, Crawford AC, Fettiplace R (2005) Force generation by mammalian hair bundles supports a role in cochlear amplification. *Nature* 433:880-883.
- Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, Moser T (2005) Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory signalling. *Nature* 434:889-894.
- Kiang NY, Rho JM, Northrop CC, Liberman MC, Ryugo DK (1982) Hair-cell innervation by spiral ganglion cells in adult cats. *Science* 217:175-177.
- Kiang NYS, Moxon EC, Kahn AR (1976) The relationship of gross potentials recorded from the cochlea to single unit activity in the auditory nerve. In: *Electrocochleography* (Rubin, R. et al., eds), pp 95-115 University Park Press, Baltimore.
- Knirsch M, Brandt N, Braig C, Kuhn S, Hirt B, Munkner S, Knipper M, Engel J (2007) Persistence of $\text{Ca}_v1.3$ Ca^{2+} channels in mature outer hair cells supports outer hair cell afferent signaling. *J Neurosci* 27:6442-6451.
- Kobayasi KI, Riquimaroux H (2012) Classification of vocalizations in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Acoust Soc Am* 131:1622-1631.
- Konishi T, Mendelsohn M (1970) Effect of ouabain on cochlear potentials and endolymph composition in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 69:192-199.
- Konishi T, Salt AN (1980) Permeability to potassium of the endolymph-perilymph barrier and its possible relation to hair cell function. *Exp Brain Res* 40:457-463.
- Kozlov AS, Risler T, Hudspeth AJ (2007) Coherent motion of stereocilia assures the concerted gating of hair-cell transduction channels. *Nat Neurosci* 10:87-92.
- Kuijpers W, Van der Vleuten AC, Bonting SL (1967) Cochlear function and sodium and potassium activated adenosine triphosphatase. *Science* 157:949-950.
- Kujawa SG, Glattko TJ, Fallon M, Bobbin RP (1993) Contralateral sound suppresses distortion product otoacoustic emissions through cholinergic mechanisms. *Hear Res* 68:97-106.
- Kujawa SG, Glattko TJ, Fallon M, Bobbin RP (1994) A nicotinic-like receptor mediates suppression of distortion product otoacoustic emissions by contralateral sound. *Hear Res* 74:122-134.
- Kujawa SG, Liberman MC (2006) Acceleration of age-related hearing loss by early noise exposure: evidence of a misspent youth. *J Neurosci* 26:2115-2123.
- Kujawa SG, Liberman MC (2009) Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 29:14077-14085.
- Kuwada S, Batra R, Maher VL (1986) Scalp potentials of normal and hearing-impaired subjects in response to sinusoidally amplitude-modulated tones. *Hear Res* 21:179-192.
- Lang H, Schulte BA, Schmiedt RA (2005) Ouabain induces apoptotic cell death in type I spiral ganglion neurons, but not type II neurons. *J Assoc Res Otolaryngol* 6:63-74.
- Le Prell CG, Shore SE, Hughes LF, Bledsoe SC, Jr. (2003) Disruption of lateral efferent pathways: functional changes in auditory evoked responses. *J Assoc Res Otolaryngol* 4:276-290.
- Lee MP, Ravenel JD, Hu RJ, Lustig LR, Tomaselli G, Berger RD, Brandenburg SA, Litz TJ, Bunton TE, Limb C, Francis H, Gorelikow M, Gu H, Washington K, Argani P, Goldenring JR, Coffey RJ, Feinberg AP (2000) Targeted disruption of the *Kvlqt1* gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice. *J Clin Invest* 106:1447-1455.

- Lenzi D, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM (2002) Depolarization redistributes synaptic membrane and creates a gradient of vesicles on the synaptic body at a ribbon synapse. *Neuron* 36:649-659.
- Lenzi D, Runyeon JW, Crum J, Ellisman MH, Roberts WM (1999) Synaptic vesicle populations in saccular hair cells reconstructed by electron tomography. *J Neurosci* 19:119-132.
- Letts VA, Valenzuela A, Dunbar C, Zheng QY, Johnson KR, Frankel WN (2000) A new spontaneous mouse mutation in the *Kcne1* gene. *Mamm Genome* 11:831-835.
- Li GL, Keen E, Andor-Ardo D, Hudspeth AJ, von Gersdorff H (2009) The unitary event underlying multiquantal EPSCs at a hair cell's ribbon synapse. *J Neurosci* 29:7558-7568.
- Liberman LD, Wang H, Liberman MC (2011) Opposing gradients of ribbon size and AMPA receptor expression underlie sensitivity differences among cochlear-nerve/hair-cell synapses. *J Neurosci* 31:801-808.
- Liberman MC (1978) Auditory-nerve response from cats raised in a low-noise chamber. *J Acoust Soc Am* 63:442-455.
- Liberman MC (1980) Morphological differences among radial afferent fibers in the cat cochlea: an electron-microscopic study of serial sections. *Hear Res* 3:45-63.
- Liberman MC (1982) Single-neuron labeling in the cat auditory nerve. *Science* 216:1239-1241.
- Liberman MC (1991) Central projections of auditory-nerve fibers of differing spontaneous rate. I. Anteroventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 313:240-258.
- Liberman MC, Dodds LW (1984) Single-neuron labeling and chronic cochlear pathology. III. Stereocilia damage and alterations of threshold tuning curves. *Hear Res* 16:55-74.
- Liberman MC, Gao J, He DZ, Wu X, Jia S, Zuo J (2002) Prestin is required for electromotility of the outer hair cell and for the cochlear amplifier. *Nature* 419:300-304.
- Liberman MC, Oliver ME (1984) Morphometry of intracellularly labeled neurons of the auditory nerve: correlations with functional properties. *J Comp Neurol* 223:163-176.
- Lin HW, Furman AC, Kujawa SG, Liberman MC (2011) Primary neural degeneration in the Guinea pig cochlea after reversible noise-induced threshold shift. *J Assoc Res Otolaryngol* 12:605-616.
- Lobarinas E, Salvi R, Ding D (2013) Insensitivity of the audiogram to carboplatin induced inner hair cell loss in chinchillas. *Hear Res* 302:113-120.
- Maison SF, Adams JC, Liberman MC (2003) Olivocochlear innervation in the mouse: immunocytochemical maps, crossed versus uncrossed contributions, and transmitter colocalization. *J Comp Neurol* 455:406-416.
- Makary CA, Shin J, Kujawa SG, Liberman MC, Merchant SN (2011) Age-related primary cochlear neuronal degeneration in human temporal bones. *J Assoc Res Otolaryngol* 12:711-717.
- Marcus DC, Marcus NY, Thalmann R (1981) Changes in cation contents of stria vascularis with ouabain and potassium-free perfusion. *Hear Res* 4:149-160.
- Martin P, Hudspeth AJ (1999) Active hair-bundle movements can amplify a hair cell's response to oscillatory mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14306-14311.
- Martin WL, Schwegler, J. W., Shi, Y., Pratt, H., and Adler, S. (1995) Developing an objective measurement tool for evaluating tinnitus: spectral averaging. In: *Proceedings of the Fifth International Tinnitus Seminar*(Vernon, G. R. a. J., ed), pp 127-133 Portland.
- Matsubara A, Kawabata Y, Takumi Y, Usami S, Shinkawa H, Haruta A, Matsuda K, Tono T (1998) Quantitative immunogold cytochemistry reveals sources of glutamate release in inner ear ischemia. *Acta Otolaryngol Suppl* 539:48-51.
- McCabe PA, Dey FL (1965) The Effect of Aspirin Upon Auditory Sensitivity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 74:312-325.
- McLean WJ, Smith KA, Glowatzki E, Pyott SJ (2009) Distribution of the Na,K-ATPase alpha subunit in the rat spiral ganglion and organ of corti. *J Assoc Res Otolaryngol* 10:37-49.
- McMahon CM, Patuzzi RB (2002) The origin of the 900 Hz spectral peak in spontaneous and sound-evoked round-window electrical activity. *Hear Res* 173:134-152.

- Merchan-Perez A, Liberman MC (1996) Ultrastructural differences among afferent synapses on cochlear hair cells: correlations with spontaneous discharge rate. *J Comp Neurol* 371:208-221.
- Meric C, Collet L (1992) Visual attention and evoked otoacoustic emissions: a slight but real effect. *Int J Psychophysiol* 12:233-235.
- Meyer AC, Frank T, Khimich D, Hoch G, Riedel D, Chapochnikov NM, Yarin YM, Harke B, Hell SW, Egner A, Moser T (2009) Tuning of synapse number, structure and function in the cochlea. *Nat Neurosci* 12:444-453.
- Moser T, Beutner D (2000) Kinetics of exocytosis and endocytosis at the cochlear inner hair cell afferent synapse of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:883-888.
- Moser T, Predoehl F, Starr A (2013) Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol Neurotol* 34:995-1004.
- Muller M (1996) The cochlear place-frequency map of the adult and developing Mongolian gerbil. *Hear Res* 94:148-156.
- Muller M, Robertson D (1991) Relationship between tone burst discharge pattern and spontaneous firing rate of auditory nerve fibres in the guinea pig. *Hear Res* 57:63-70.
- Neef J, Gehrt A, Bulankina AV, Meyer AC, Riedel D, Gregg RG, Strenzke N, Moser T (2009) The Ca²⁺ channel subunit beta2 regulates Ca²⁺ channel abundance and function in inner hair cells and is required for hearing. *J Neurosci* 29:10730-10740.
- Nouvian R, Beutner D, Parsons TD, Moser T (2006) Structure and function of the hair cell ribbon synapse. *J Membr Biol* 209:153-165.
- O'Brien WJ, Lingrel JB, Wallick ET (1994) Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch Biochem Biophys* 310:32-39.
- Obholzer N, Wolfson S, Trapani JG, Mo W, Nechiporuk A, Busch-Nentwich E, Seiler C, Sidi S, Sollner C, Duncan RN, Boehland A, Nicolson T (2008) Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J Neurosci* 28:2110-2118.
- Oesterle E, Dallos P (1986) Intracellular recordings from supporting cells in the organ of Corti. *Hear Res* 22:229-232.
- Ohlemiller KK, Echteler SM (1990) Functional correlates of characteristic frequency in single cochlear nerve fibers of the Mongolian gerbil. *J Comp Physiol A* 167:329-338.
- Oliver D, He DZ, Klocker N, Ludwig J, Schulte U, Waldegger S, Ruppertsberg JP, Dallos P, Fakler B (2001) Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein. *Science* 292:2340-2343.
- Oliver D, Taberner AM, Thurm H, Sausbier M, Arntz C, Ruth P, Fakler B, Liberman MC (2006) The role of BKCa channels in electrical signal encoding in the mammalian auditory periphery. *J Neurosci* 26:6181-6189.
- Oliver DL (2000) Ascending efferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51:355-363.
- Pangrsic T, Lasarow L, Reuter K, Takago H, Schwander M, Riedel D, Frank T, Tarantino LM, Bailey JS, Strenzke N, Brose N, Muller U, Reisinger E, Moser T (2010) Hearing requires otoferlin-dependent efficient replenishment of synaptic vesicles in hair cells. *Nat Neurosci* 13:869-876.
- Pangrsic T, Reisinger E, Moser T (2012) Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing. *Trends Neurosci* 35:671-680.
- Parsons TD, Lenzi D, Almers W, Roberts WM (1994) Calcium-triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells. *Neuron* 13:875-883.
- Patuzzi RB, Brown DJ, McMahon CM, Halliday AF (2004) Determinants of the spectrum of the neural electrical activity at the round window: transmitter release and neural depolarisation. *Hear Res* 190:87-108.
- Plassmann W, Peetz W, Schmidt M (1987) The cochlea in gerbilline rodents. *Brain Behav Evol* 30:82-101.

- Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J (2000) Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell* 102:89-97.
- Portmann M, Cazals Y, Negrevergne M, Aran JM (1980) Transtympanic and surface recordings in the diagnosis of retrocochlear disorders. *Acta Otolaryngol* 89:362-369.
- Prijs VF (1986) Single-unit response at the round window of the guinea pig. *Hearing Research* 21:127-133.
- Puel JL (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* 47:449-476.
- Puel JL, Bobbin RP, Fallon M (1988) An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure. *Hear Res* 37:65-69.
- Puel JL, Rebillard G (1990) Effect of contralateral sound stimulation on the distortion product 2F1-F2: evidence that the medial efferent system is involved. *J Acoust Soc Am* 87:1630-1635.
- Relkin EM, Doucet JR (1991) Recovery from prior stimulation. I: Relationship to spontaneous firing rates of primary auditory neurons. *Hear Res* 55:215-222.
- Rhode WS, Smith PH (1985) Characteristics of tone-pip response patterns in relationship to spontaneous rate in cat auditory nerve fibers. *Hear Res* 18:159-168.
- Rickheit G, Maier H, Strenzke N, Andreescu CE, De Zeeuw CI, Muenscher A, Zdebik AA, Jentsch TJ (2008) Endocochlear potential depends on Cl⁻ channels: mechanism underlying deafness in Bartter syndrome IV. *EMBO J* 27:2907-2917.
- Robertson D (1984) Horseradish peroxidase injection of physiologically characterized afferent and efferent neurones in the guinea pig spiral ganglion. *Hear Res* 15:113-121.
- Robles L, Ruggero MA (2001) Mechanics of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 81:1305-1352.
- Rose JE, Brugge JF, Anderson DJ, Hind JE (1967) Phase-locked response to low-frequency tones in single auditory nerve fibers of the squirrel monkey. *J Neurophysiol* 30:769-793.
- Roux I, Hosie S, Johnson SL, Bahloul A, Cayet N, Nouaille S, Kros CJ, Petit C, Safieddine S (2009) Myosin VI is required for the proper maturation and function of inner hair cell ribbon synapses. *Hum Mol Genet* 18:4615-4628.
- Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, Perfettini I, Le Gall M, Rostaing P, Hamard G, Triller A, Avan P, Moser T, Petit C (2006) Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 127:277-289.
- Ruel J, Emery S, Nouvian R, Bersot T, Amilhon B, Van Rybroek JM, Rebillard G, Lenoir M, Eybalin M, Delprat B, Sivakumaran TA, Giros B, El Mestikawy S, Moser T, Smith RJ, Lesperance MM, Puel JL (2008) Impairment of SLC17A8 encoding vesicular glutamate transporter-3, VGLUT3, underlies nonsyndromic deafness DFNA25 and inner hair cell dysfunction in null mice. *Am J Hum Genet* 83:278-292.
- Ruel J, Nouvian R, Gervais d'Aldin C, Pujol R, Eybalin M, Puel JL (2001) Dopamine inhibition of auditory nerve activity in the adult mammalian cochlea. *Eur J Neurosci* 14:977-986.
- Russell IJ, Sellick PM (1978) Intracellular studies of hair cells in the mammalian cochlea. *J Physiol* 284:261-290.
- Russell IJ, Sellick PM (1983) Low-frequency characteristics of intracellularly recorded receptor potentials in guinea-pig cochlear hair cells. *J Physiol* 338:179-206.
- Rutherford MA, Chapochnikov NM, Moser T (2012) Spike encoding of neurotransmitter release timing by spiral ganglion neurons of the cochlea. *J Neurosci* 32:4773-4789.
- Rutherford MA, Roberts WM (2006) Frequency selectivity of synaptic exocytosis in frog saccular hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2898-2903.
- Ryugo DK, Rouiller EM (1988) Central projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers in cats: morphometric correlations with physiological properties. *J Comp Neurol* 271:130-142.
- Sachs MB, Abbas PJ (1974) Rate versus level functions for auditory-nerve fibers in cats: tone-burst stimuli. *J Acoust Soc Am* 56:1835-1847.
- Schmiedt RA (1989) Spontaneous rates, thresholds and tuning of auditory-nerve fibers in the gerbil: comparisons to cat data. *Hear Res* 42:23-35.

- Schmiedt RA, Mills JH, Boettcher FA (1996) Age-related loss of activity of auditory-nerve fibers. *J Neurophysiol* 76:2799-2803.
- Schmiedt RA, Okamura HO, Lang H, Schulte BA (2002) Ouabain application to the round window of the gerbil cochlea: a model of auditory neuropathy and apoptosis. *J Assoc Res Otolaryngol* 3:223-233.
- Schmitz F, Konigstorfer A, Sudhof TC (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron* 28:857-872.
- Schnee ME, Lawton DM, Furness DN, Benke TA, Ricci AJ (2005) Auditory hair cell-afferent fiber synapses are specialized to operate at their best frequencies. *Neuron* 47:243-254.
- Schreiner CEaS, R. L. (1987) A physiological animal model of peripheral tinnitus. In: *Proceedings of 3rd International Tinnitus Seminar*(Feldmann, H., ed), pp 100-106.
- Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J, Clause A, Kandler K, Noebels JL, Glowatzki E, Lustig LR, Edwards RH (2008) Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* 57:263-275.
- Searchfield GD, Munoz DJ, Thorne PR (2004) Ensemble spontaneous activity in the guinea-pig cochlear nerve. *Hear Res* 192:23-35.
- Sergeyenko Y, Lall K, Liberman MC, Kujawa SG (2013) Age-related cochlear synaptopathy: an early-onset contributor to auditory functional decline. *J Neurosci* 33:13686-13694.
- Sewell WF (1984) The relation between the endocochlear potential and spontaneous activity in auditory nerve fibres of the cat. *J Physiol* 347:685-696.
- Sheets L, Trapani JG, Mo W, Obholzer N, Nicolson T (2011) Ribeye is required for presynaptic Ca(V)1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells. *Development* 138:1309-1319.
- Sidi S, Busch-Nentwich E, Friedrich R, Schoenberger U, Nicolson T (2004) gemini encodes a zebrafish L-type calcium channel that localizes at sensory hair cell ribbon synapses. *J Neurosci* 24:4213-4223.
- Siegel JH (1992) Spontaneous synaptic potentials from afferent terminals in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 59:85-92.
- Sokolich WG, Smith RL (1973) Easy access to the auditory nerve in the Mongolian gerbil. *J Acoust Soc Am* 54:283.
- Spoendlin H (1969) Innervation patterns in the organ of corti of the cat. *Acta Otolaryngol* 67:239-254.
- Spoendlin H (1972) Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol* 73:235-248.
- Starr A, McPherson D, Patterson J, Don M, Luxford W, Shannon R, Sininger Y, Tonakawa L, Waring M (1991) Absence of both auditory evoked potentials and auditory percepts dependent on timing cues. *Brain* 114 (Pt 3):1157-1180.
- Starr A, Picton TW, Sininger Y, Hood LJ, Berlin CI (1996) Auditory neuropathy. *Brain* 119 (Pt 3):741-753.
- Starr A, Sininger YS, Pratt H (2000) The varieties of auditory neuropathy. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 11:215-230.
- Taberner AM, Liberman MC (2005) Response properties of single auditory nerve fibers in the mouse. *J Neurophysiol* 93:557-569.
- Tang Y (2011) Impact de la perte des neurones cochléaires sur la fonction auditive. In: *Neurosciences Montpellier: Montpellier I*.
- Tarnowski BI, Schmiedt RA, Hellstrom LI, Lee FS, Adams JC (1991) Age-related changes in cochleas of mongolian gerbils. *Hear Res* 54:123-134.
- Tasaki I (1954) Nerve impulses in individual auditory nerve fibers of guinea pig. *J Neurophysiol* 17:97-122.
- Tsuji J, Liberman MC (1997) Intracellular labeling of auditory nerve fibers in guinea pig: central and peripheral projections. *J Comp Neurol* 381:188-202.
- Tucker T, Fettiplace R (1995) Confocal imaging of calcium microdomains and calcium extrusion in turtle hair cells. *Neuron* 15:1323-1335.

- Versnel H, Prijs VF, Schoonhoven R (1990) Single-fibre responses to clicks in relationship to the compound action potential in the guinea pig. *Hear Res* 46:147-160.
- Versnel H, Prijs VF, Schoonhoven R (1992) Round-window recorded potential of single-fibre discharge (unit response) in normal and noise-damaged cochleas. *Hear Res* 59:157-170.
- Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, Liu J, McLaughlin KJ, Lesage F, Marcus DC, Lazdunski M, Heinemann SF, Barhanin J (1996) Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 17:1251-1264.
- Wan L, Almers W, Chen W (2005) Two ribeye genes in teleosts: the role of Ribeye in ribbon formation and bipolar cell development. *J Neurosci* 25:941-949.
- Wang B (1979) The relation between the compound action potential and unit discharges of the auditory nerve. In: Doctoral dissertation, Dept of Electrical Engineering and Computer Science, vol. PhD Cambridge: M.I.T.
- Weisz CJ, Lehar M, Hiel H, Glowatzki E, Fuchs PA (2012) Synaptic transfer from outer hair cells to type II afferent fibers in the rat cochlea. *J Neurosci* 32:9528-9536.
- Westerman LA, Smith RL (1984) Rapid and short-term adaptation in auditory nerve responses. *Hear Res* 15:249-260.
- Winter IM, Robertson D, Yates GK (1990) Diversity of characteristic frequency rate-intensity functions in guinea pig auditory nerve fibres. *Hear Res* 45:191-202.
- Wong AB, Rutherford MA, Gabrielaitis M, Pangrsic T, Gottfert F, Frank T, Michanski S, Hell S, Wolf F, Wichmann C, Moser T (2014) Developmental refinement of hair cell synapses tightens the coupling of Ca²⁺ influx to exocytosis. *EMBO J* 33:247-264.
- Yasunaga S, Grati M, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Mustapha M, Salem N, El-Zir E, Loiselet J, Petit C (1999) A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness. *Nat Genet* 21:363-369.
- Yuhas WA, Fuchs PA (1999) Apamin-sensitive, small-conductance, calcium-activated potassium channels mediate cholinergic inhibition of chick auditory hair cells. *J Comp Physiol A* 185:455-462.
- Zeng FG, Kong YY, Michalewski HJ, Starr A (2005) Perceptual consequences of disrupted auditory nerve activity. *J Neurophysiol* 93:3050-3063.
- Zenisek D, Davila V, Wan L, Almers W (2003) Imaging calcium entry sites and ribbon structures in two presynaptic cells. *J Neurosci* 23:2538-2548.
- Zenisek D, Horst NK, Merrifield C, Sterling P, Matthews G (2004) Visualizing synaptic ribbons in the living cell. *J Neurosci* 24:9752-9759.
- Zhao HB, Santos-Sacchi J (1999) Auditory collusion and a coupled couple of outer hair cells. *Nature* 399:359-362.
- Zheng J, Ramamoorthy S, Ren T, He W, Zha D, Chen F, Magnusson A, Nuttall AL, Fridberger A (2011) Persistence of past stimulations: storing sounds within the inner ear. *Biophys J* 100:1627-1634.
- Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* 405:149-155.

Contexte : La réponse synchrone des fibres du nerf auditif, évaluée à partir de l'onde I des potentiels d'action évoqués auditifs (PEA), ou à partir du potentiel d'action composite (PAC) du nerf auditif, est déterminante pour le dépistage des neuropathies cochléaires. De récentes études ont toutefois montré que le seuil et l'amplitude de cette réponse pouvaient être absolument normaux malgré une perte importante (désafférentation) de fibres du nerf auditif. Dans ce travail de thèse, nous proposons une nouvelle méthode d'exploration fonctionnelle, potentiellement applicable à l'homme, rendant mieux compte de l'intégrité du complexe CCI - fibres afférentes.

Matériel et méthodes : Chez des gerbilles, une perte sélective de fibres du nerf auditif a été induite par application d'une faible concentration d'ouabaïne dans la niche de la fenêtre ronde de la cochlée. Cette neuropathie a été caractérisée par des comptages de synapses (immunohistochimie/imagerie confocale 3D) et l'enregistrement de l'activité unitaire de fibres du nerf auditif. La réponse synchrone (PAC) et la réponse soutenue du nerf auditif ont été enregistrées 6 jours après l'application d'ouabaïne, à l'aide d'une électrode de recueil disposée dans la niche de la fenêtre ronde de la cochlée.

Résultats : L'application d'ouabaïne induit une perte spécifique des fibres à basse activité spontanée ($AS < 0,5$ potentiel d'action/sec) comme observé au cours du vieillissement et après une surexposition sonore. La disparition de cette population de fibres est indétectable à l'aide du PAC car leur réponse unitaire est à la fois retardée et désynchronisée. L'amplitude de la réponse soutenue du nerf auditif se révèle être un bien meilleur indicateur de la perte des fibres à basse activité spontanée. Pour aller plus loin, nous avons exploré une méthode permettant d'étudier le décours temporel de l'activité des fibres auditives. Cette approche rend compte des mécanismes de fusion vésiculaire (libération rapide et soutenue) de la première synapse auditive.

Conclusion : L'analyse de la réponse soutenue du nerf auditif facilite le dépistage et la caractérisation des pertes de fibres auditives. D'autre part, l'analyse de la réponse temporelle de ces fibres permet d'étudier la neurotransmission de la première synapse auditive. Appliquée à l'homme, cette méthode devrait améliorer le dépistage des neuropathies cochléaires, avec une meilleure différenciation des atteintes d'origine synaptique et/ou neuronale.

Mots clés : cochlée, nerf auditif, potentiel d'action composite, activité soutenue du nerf auditif, enregistrements unitaires, ouabaïne, neuropathie.

Background : The synchronous activation of the auditory nerve fibers (ANFs), is commonly studied through the compound action potential (CAP), or the auditory brainstem responses (ABR), to probe deafness in experimental and clinical settings. Recent studies have shown that substantial ANF loss can coexist with normal hearing threshold, and even unchanged CAP amplitude, making the detection of auditory neuropathies difficult. In this study, we took advantage of the round window neural noise (RWNN) to probe ANF loss in a physiologically-relevant model of neuropathy.

Material and methods : ANF loss was induced by the application of ouabain onto the round window niche. CAP and RWNN of the gerbil's cochlea were recorded through an electrode placed onto the round window niche, 6 days after the ouabain application. Afferent synapse counts and single-unit recordings were carried-out to determine the degree and the nature of ANF loss, respectively.

Results : Application of a low ouabain-dose into the gerbil RW niche elicits a specific degeneration of low spontaneous rate (SR) fibers, as shown by single-unit recordings. Simultaneous recordings (CAP/single-unit) demonstrate that low-SR fibers have a weak contribution to the CAP amplitude because of their delayed and broad first spike latency distribution. However, the RWNN amplitude decreases with the degree of synaptic loss. The RWNN method is therefore more sensitive than CAP to detect low-SR fiber loss, most probably because it reflects the sustained discharge rate of ANFs. Based on these data, we proposed a far-field method (Peri-stimulus time response-PSTR) to assess the fast and sustained vesicular release at the first auditory synapse.

Conclusion : The round window neural noise is a faithful proxy to probe the degree and the SR-based nature of fiber loss. This method could be translated into the clinic to probe hidden hearing loss and orient the practitioner toward synaptopathy and/or neuropathy.

Key words: Cochlea, auditory nerve, compound action potential, round window neural noise, single fiber recording, ouabain-induced neuropathy